

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JULIANA MACHADO BRÊTAS

**CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS
SECOS DA CASCA DO FRUTO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.)
COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS MAGISTRAIS**

Belo Horizonte – MG

2018

JULIANA MACHADO BRÊTAS

**CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS
SECOS DA CASCA DO FRUTO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.)
COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS MAGISTRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti – UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César – UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino – UFMG

Belo Horizonte – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Nada da vida é construído sozinho. Foram muitos os que estiveram comigo e contribuíram para a realização deste trabalho. Alguns participaram em apenas momentos pontuais, outros em todos. Mas, de alguma maneira, todos contribuíram direta ou indiretamente, com seus conhecimentos e com as experiências vividas e partilhadas. Meus sinceros agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, não apenas orientador deste trabalho, mas estimado mentor da minha carreira farmacêutica, que desde a graduação depositou sua confiança em mim e me agraciou com tanto conhecimento, dedicação, amizade, disponibilidade e empenho em contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Isabela da Costa César, minha querida coorientadora, por confiar a mim a proposta inicial deste trabalho e apoiar a conduta e construção de cada etapa desenvolvida, sempre com tanta atenção e amizade, refletida em inúmeros conselhos, ensinamentos e dicas que tanto contribuíram para minha formação.

Ao Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino, que abriu novos horizontes para minha carreira, promovendo o enriquecimento deste trabalho e a ampliação dos meus conhecimentos para uma nova área das Ciências Farmacêuticas.

Aos Professores Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota e Dr. Renes de Resende Machado pela disponibilidade e valiosa colaboração na avaliação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia, em especial ao Prof. Dr. Christian Fernandes, à Prof. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares e ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves pelo convívio diário e pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

Ao querido amigo Diego, não apenas coorientando, mas parceiro que esteve presente em todas as etapas deste trabalho e em diversos outros projetos que realizamos juntos. Por todo apoio, empenho, dedicação e entrega à pesquisa durante esses anos, sonhando junto comigo e tornando a caminhada mais leve e divertida a cada desafio e conquista que tivemos.

Aos colegas Mateus, Rita, Fernanda e Felipe por partilharem comigo seus conhecimentos específicos e me ajudarem na realização de algumas etapas deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e do CEDAFAR, em especial, Naialy, Mateus, Talita, Pedro Franco, Juliana, Carlos, Iara, Lúcia, Tânia, Leonardo, Luciano, André, Ana Carolina, Pedro Reis, Ingrid, Yuri e Dérick pelas trocas de conhecimento, dicas e ideias tão importantes para nossa formação. Pela amizade construída e por tornarem a jornada mais fácil ao dividirmos nossas alegrias, angústias, dúvidas e conquistas.

Aos meus amados pais, Tânia e Otto, por terem plantado em mim a paixão pelo conhecimento, proporcionando as condições necessárias para que eu pudesse chegar até aqui, sempre confiando e acreditando em mim. Pelo infinito amor, carinho, cuidado, dedicação e apoio.

À minha irmã Camila, minha amiga e colega de profissão, por todo companheirismo, amor, carinho, ajuda e conselhos não apenas durante a realização deste trabalho, mas por toda a minha vida.

Ao Daniel, meu marido, meu amor, meu amigo... Sempre o meu anjo em todas as áreas da minha vida, iluminando meus caminhos e meus dias com sua alegria, leveza, companheirismo, apoio e confiança imensuráveis. Por me encorajar diante das dificuldades, acalantar minhas angústias e amplificar minhas alegrias e conquistas. Pela paciência e parceria neste trabalho, apoiando, compreendendo e ajudando direta e indiretamente a concluir mais essa etapa em nossas vidas.

A todos os amigos e familiares, em especial ao Ivens por todo o apoio e paciência ao longo desses anos, ao Paulinho por todos os momentos vividos juntos que tornaram a caminhada mais leve e à Irene, Esdras, Juninho e Rayssa pelo carinho e constante torcida e apoio à minha carreira.

A Deus, por estar comigo em todos os momentos e por guiar meus passos, colocando em meu caminho oportunidades nos momentos certos e me ensinando a encarar os desafios da vida com coragem, confiança, perseverança, fé, respeito e amor.

“Nunca considere seu estudo como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza no reino do espírito para seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual suas futuras obras pertencem.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A *Punica granatum* L., popularmente conhecida como romã ou pomegranate, é originária da Ásia, sendo cultivada em diversas regiões subtropicais e tropicais em todo o mundo. Consolidada na medicina tradicional, com ação antibacteriana, vermífuga, adstringente, dentre outras, a demanda por essa planta e pelos produtos dela derivados vêm crescendo significativamente nos últimos anos, devido ao maior conhecimento das propriedades terapêuticas e à facilidade de aquisição de derivados, como o extrato seco da casca do fruto (ESF). A parte mais utilizada na terapêutica, incluindo a produção dos ESFs, é o pericarpo, o qual é rico em compostos fenólicos, como a punicalagina e o ácido elágico. Variações nos teores desses marcadores ativos podem impactar diretamente nas atividades biológicas, de modo que o controle da qualidade dos ESFs é fundamental para assegurar a autenticidade e a ausência de adulteração por adição de ácido elágico ou outras substâncias. Desse modo, objetivou-se realizar o controle de qualidade físico-químico e biológico de ESFs comercializados em farmácias magistrais, avaliando o impacto da composição dos extratos sobre atividades biológicas. O controle de qualidade físico-químico foi realizado por meio da identificação por cromatografia em camada delgada (CCD), da determinação da umidade pelo método volumétrico, do teor de taninos totais por método espectrofotométrico miniaturizado, e dos teores de ácido elágico e punicalagina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (CLAE-UV). Já o controle de qualidade biológico foi feito com a avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória (ensaio de edema de pata induzido por carragenina em camundongos), avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana utilizando técnicas de microdiluição em caldo e de difusão em ágar e atividade antioxidante por meio do método de redução do brometo de azul de tiazoliltetrazólio (MTT). Também foi avaliado o impacto dos ESFs sobre a hemostasia por determinação automatizada do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo de protrombina em plasma humano. Os resultados obtidos na identificação e determinação dos teores de taninos totais e de ácido elágico e punicalagina foram concordantes entre si e com o aspecto dos ESFs, de modo que extratos de cor cinza possuem elevados teores de ácido elágico e baixos de punicalagina e taninos totais, apresentando mancha característica do ácido elágico nas placas cromatográficas. Para esses ESFs não foram obtidas boas respostas nos ensaios para avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante, ao contrário do observado para a atividade anti-inflamatória. Em contrapartida, ESFs de cor marrom ou amarela, com altos teores de punicalagina e de taninos totais, baixos teores de ácido elágico e manchas características da punicalagina nas placas cromatográficas, apresentaram atividade antibacteriana e antioxidante expressivas de acordo com os testes realizados. Não foi verificado nenhum impacto sobre a hemostasia considerando a dose usualmente recomendada. Diante dos resultados obtidos, fica evidente a importância da ação das agências regulatórias e fiscalizadoras sobre a produção e comercialização de ESFs, sendo fundamental maior rigor no controle de qualidade desses produtos, de modo a assegurar o efeito terapêutico e a segurança do paciente. Desse modo, pode-se concluir que o trabalho contribuiu tanto para o enriquecimento científico nacional e mundial, quanto para a saúde pública.

Palavras-chave: *Punica granatum* L.. Pomegranate. Romã. Ácido elágico. Punicalagina. Extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum* L. comerciais.

ABSTRACT

Punica granatum L., popularly known as *romã* or pomegranate, originates in Asia, being cultivated in several subtropical and tropical regions around the world. Consolidated in traditional medicine with antibacterial, vermifuge, astringent action, among others, the demand for this plant and derived products has grown significantly in recent years, due to the greater knowledge of the therapeutic properties and the ease of acquisition of derivatives, such as the fruit peel dried extracts (FDEs). The most used part in therapeutics, including the production of FDEs, is the pericarp, which is rich in phenolic compounds such as punicalagin and ellagic acid. Variations in the levels of these active markers may have a direct impact on biological activities, so that the quality control of the FDEs is essential to ensure the authenticity and absence of adulteration by the addition of ellagic acid or other substances. In this way, the objective was to perform the physical-chemical and biological quality control of FDEs marketed in compounding pharmacies, evaluating the impact of the composition of the extracts on biological activities. The physical-chemical quality control was performed by means of the identification by thin layer chromatography (TLC), determination of the moisture by the volumetric method, total tannins content by a miniaturized spectrophotometric method, and contents of ellagic acid and punicalagin by high performance liquid chromatography with detection in the ultraviolet region (HPLC-UV). Biological quality control was performed with the *in vivo* evaluation of the anti-inflammatory activity (carrageenan-induced paw edema in mice), *in vitro* evaluation of antibacterial activity using broth microdilution and agar diffusion techniques and antioxidant activity by the method involving the reduction of thiazolyl tetrazolium blue bromide (MTT). The impact of FDEs on hemostasis was also evaluated by automated determination of activated partial thromboplastin time and prothrombin time in human plasma. The results obtained in the identification and determination of the total tannins and ellagic acid and punicalagin contents were consistent with each other and with the appearance of the FDEs, so that grey extracts have high levels of ellagic acid and low levels of punicalagin and total tannins, showing the characteristic spot of ellagic acid in the chromatographic plates. For these FDEs, good responses were not obtained in the assays for evaluation of antibacterial and antioxidant activities, contrary to the observed for the anti-inflammatory activity. On the other hand, brown or yellow FDEs with high levels of punicalagin and total tannins, low levels of ellagic acid and characteristic spots of punicalagin on the chromatographic plates presented expressive antibacterial and antioxidant activity according to the performed tests. No impact on hemostasis was observed considering the dose usually recommended. In view of the results, it is evident the importance of the regulatory and supervisory agencies' actions on the production and commercialization of FDEs, being fundamental more rigour in the quality control of these products, in order to assure the therapeutic effect and the safety of the patient. Thus, it can be concluded that the work contributed both to national and global scientific enrichment and to public health.

Key words: *Punica granatum* L.. Pomegranate. *Romã*. Ellagic acid. Punicalagin. Dried extracts of the fruit peel of *Punica granatum* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fruto da *Punica granatum* L. (A) e suas frações: extrato seco da casca (B), sementes (C) e casca dessecada (D)..... 28**
- Figura 2 – Estrutura química dos principais compostos fenólicos da casca do fruto de *Punica granatum* L.: antocianinas (A), catequina (B), punicalagina (C), punicalina (D), ácido elágico (E) e ácido gálico (F)..... 29**
- Figura 3 – Cor e aspecto macroscópico dos ESFs comerciais (1 a 18), do ESF controle (19) e dos padrões de ácido elágico e punicalagina..... 69**
- Figura 4 – Etapas do processo de produção do ESF controle: (A) fruto de *Punica granatum* L., (B) pó da casca do fruto seca, (C) extrato e resíduo no terceiro ciclo de extração, (D) extrato total obtido após os três ciclos, (E) extrato concentrado, (F) ESF controle final..... 74**
- Figura 5 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos. (A) Ácido elágico a 50,0 µg/mL em metanol. (B) Punicalagina a 50,0 µg/mL em metanol. (C) Espectro de absorção 3D..... 80**
- Figura 6 – Cromatograma obtido por CLAE-UV a 375 nm para ácido elágico e punicalagina a 50,0 µg/mL..... 80**
- Figura 7 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de ácido elágico e punicalagina para os ESFs 2, 11 e 19 a 100% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL) no ensaio de seletividade frente a matrizes com diferentes composições..... 83**
- Figura 8 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de cada substância testada no ensaio de seletividade frente a possíveis componentes da matriz..... 84**

/continua.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (conclusão)

Figura 9 – Cromatogramas obtidos a 375 nm no estudo de degradação para as soluções de ácido elágico e punicalagina em metanol e hidróxido de sódio 1 mol/L no início do teste (tempo 0 h) e para a amostra branco nas mesmas condições.....	87
Figura 10 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de ácido elágico e punicalagina para as soluções do ESF 19 nas diferentes condições de estresse, no último tempo de coleta (após aquecimento – 48 h).....	88
Figura 11 – Curvas analíticas em matriz e em solução obtidas na validação do método por CLAE-UV para determinação dos teores de ácido elágico (A) e punicalagina (B) em ESFs.....	92
Figura 12 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de ácido elágico (A) e punicalagina (B).....	93
Figura 13 – Cromatogramas obtidos a 375 nm na análise dos ESFs (1, 2, 11 e 19) a 100% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL).....	100
Figura 14 – Curvas analíticas em matriz e em solução obtidas na validação do método espectrofotométrico miniaturizado para determinação do teor de taninos totais em ESFs.....	106
Figura 15 – Cromatogramas obtidos com o método de CCD desenvolvido para os padrões de ácido elágico e punicalagina e para os ESFs 1, 2, 11, 14 e 19.....	117
Figura 16 – Conversão do MTT em formazan.....	129
Figura 17 – Absorvâncias (amostra - branco) e %AC obtidas para os padrões de ácido elágico e punicalagina, para o controle positivo e para cada ESF.....	151
Figura 18 – Curvas de variação do volume da pata ao longo do tempo (A) e ASCs (B) para os controles positivo e negativo, ESFs e padrões.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumos das condições dos métodos cromatográficos mais relevantes descritos na literatura para quantificação de ácido elágico e/ou punicalagina por CLAE-UV em produtos derivados da <i>Punica granatum</i> L.....	39
Tabela 2 – Resumo das condições dos métodos de identificação descritos na literatura para identificação por CCD do perfil cromatográfico de produtos derivados da <i>Punica granatum</i> L. e de marcadores desses produtos.....	43
Tabela 3 – Parâmetros e condições do método analítico desenvolvido....	51
Tabela 4 – Proposta de diluição das soluções estoque e teste de ácido elágico e punicalagina e de ESFs utilizadas na validação e aplicação do método bioanalítico.....	55
Tabela 5 – Classificação dos ESFs de acordo com o teor de ácido elágico ou de taninos totais declarado e resumo das principais informações contidas nos laudos fornecidos pelos fabricantes/distribuidores.....	68
Tabela 6 – Resultados obtidos na determinação da umidade nos ESFs pelo método volumétrico.....	75
Tabela 7 – Parâmetros modificados durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs.....	78
Tabela 8 – Resumo dos resultados obtidos na avaliação da degradação de ácido elágico, punicalagina e do ESF controle (19) sob condições de estresse.....	85
Tabela 9 – Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários a um nível de significância de 5%.....	90
Tabela 10 – Dados obtidos para construção das curvas de calibração de ácido elágico e punicalagina.....	91

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 11 – Valores dos limites inferiores de detecção e de quantificação determinados na validação.....	94
Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da precisão com três matrizes para ácido elágico (ESFs 2, 11 e 19).....	96
Tabela 13 – Resultados obtidos na análise da precisão com três matrizes para punicalagina (ESFs 11, 14 e 19).....	96
Tabela 14 – Resultados da avaliação da exatidão do método por meio da recuperação de ácido elágico e punicalagina adicionados à matriz (ESF 11) a 50% da concentração de trabalho.....	97
Tabela 15 – Teores de ácido elágico e punicalagina determinados na análise dos ESFs por CLAE-UV, utilizando o método analítico desenvolvido e validado. Teores declarados nos laudos e cores dos ESFs.....	99
Tabela 16 – Resultados obtidos na análise da precisão do método.....	104
Tabela 17 – Resultados obtidos na análise da exatidão do método.....	104
Tabela 18 – Conteúdos de taninos totais obtidos para os 18 ESFs comerciais e ESF controle e principais informações contidas nos laudos fornecidos pelos fabricantes/distribuidores para comparação com os resultados obtidos.....	107
Tabela 19 – Comparação dos custos entre o método miniaturizado e o método padrão descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição.....	110
Tabela 20 – Resumo das condições testadas durante a otimização do método por cromatografia em camada delgada.....	113
Tabela 21 – Resultados obtidos na análise por CCD para os ESFs e padrões de ácido elágico e punicalagina. Teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs e cores dos mesmos.....	116

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

Tabela 22 – Subgrupos e preparações utilizadas no estudo de avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs.....	140
Tabela 23 – Resultados obtidos na triagem da atividade antibacteriana dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina pelo método de microdiluição em caldo para as cepas testadas e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs..	145
Tabela 24 – Resultados obtidos na determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina pelo método de microdiluição em caldo e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs.....	146
Tabela 25 – Diâmetro dos halos de inibição em milímetros obtidos na avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs pelo método de difusão em ágar para as cepas testadas e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido ascórbico
AE	Ácido elágico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
C ₁₈	Octadecilsilano
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector espectrofotométrico na região do ultravioleta
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CMC	Carboximetilcelulose
CNS/MS	Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde
COFID	Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX	Ciclo-oxigenase

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

CV%	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação Comum Brasileira
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>DP</i>	Desvio padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DXM	Dexametasona
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESF	Extrato seco da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L.
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAB-MS	<i>Fast-atom bombardment mass spectrometry</i>
FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte
GGMED	Gerência Geral de Medicamentos
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LID	Limite inferior de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEKC	Cromatografia eletrocínética capilar micelar
MTT	Brometo de azul de tiazoliltetrazólio (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (conclusão)

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
PDA	Detector de arranjo de fotodiodos
PEG	Polietilenoglicol
PN	Punicalagina
PNA	Polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele
PT	Polifenóis totais
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RC	Celulose regenerada
RMN	Ressonância magnética nuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
T _{máx}	Tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
%AC	Percentual da capacidade antioxidante em relação ao ácido ascórbico

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear
b	Coeficiente angular
cm	Centímetro
F	Razão entre as variâncias
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
log P	Coeficiente de partição octanol/água
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
r	Coeficiente de correlação
Rf	Fator de retenção
UI	Unidade Internacional
v/v	Volume/volume
α	Nível de significância
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – ASPECTOS GERAIS

I.1	INTRODUÇÃO.....	24
I.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
I.2.1	<i>Punica granatum</i> L.....	26
I.2.2	Composição fitoquímica.....	28
I.2.3	Atividades biológicas e comercialização em farmácias magistrais.....	29
I.2.4	Aspectos regulatórios.....	31
I.2.5	Farmacocinética e biodisponibilidade dos marcadores vegetais ativos.....	32
I.3	OBJETIVOS.....	33
I.3.1	Objetivo geral.....	33
I.3.2	Objetivos específicos.....	33

CAPÍTULO II – CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE *Punica granatum* L.

II.1	INTRODUÇÃO.....	35
II.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	36
II.2.1	Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV.....	36
II.2.2	Determinação do teor de taninos totais em ESFs por espectrofotometria de absorção na região do UV-visível.....	40
II.2.3	Identificação de ESFs por CCD.....	41
II.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
II.3.1	Materiais.....	44
II.3.1.1	<u>Substâncias químicas de referência, ESFs e excipientes</u>	44
II.3.1.2	<u>Equipamentos e instrumentos</u>	44

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

.3.1.3	<u>Consumíveis e vidrarias</u>	45
.3.1.4	<u>Reagentes</u>	46
.3.2	Métodos	47
.3.2.1	<u>Seleção e aquisição dos ESFs comerciais</u>	47
.3.2.2	<u>Preparo do ESF controle</u>	48
.3.2.3	<u>Determinação da umidade dos ESFs pelo método volumétrico</u> ..	49
.3.2.4	<u>Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs por CLAE-UV</u>	50
.3.2.4.1	<u>Desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV</u>	50
.3.2.4.2	<u>Validação do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV</u>	52
.3.2.4.2.1	<i><u>Seletividade</u></i>	52
.3.2.4.2.2	<i><u>Linearidade da faixa de trabalho</u></i>	53
.3.2.4.2.3	<i><u>Efeito matriz</u></i>	56
.3.2.4.2.4	<i><u>Limites de quantificação e de detecção</u></i>	56
.3.2.4.2.5	<i><u>Precisão</u></i>	57
.3.2.4.2.6	<i><u>Exatidão</u></i>	58
.3.2.4.2.7	<i><u>Robustez e adequabilidade do sistema</u></i>	58
.3.2.4.3	<u>Aplicação do método desenvolvido e validado na análise dos ESFs</u>	60
.3.2.5	<u>Determinação do teor de taninos totais nos ESFs por método espectrofotométrico miniaturizado</u>	60
.3.2.5.1	<u>Desenvolvimento do método espectrofotométrico miniaturizado</u>	60
.3.2.5.2	<u>Preparo das amostras e procedimento desenvolvido</u>	61

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

.3.2.5.3	<u>Validação do método espectrofotométrico miniaturizado</u>	62
.3.2.5.3.1	<u>Linearidade e limites de quantificação e de detecção</u>	62
.3.2.5.3.2	<u>Precisão e exatidão</u>	63
.3.2.5.3.3	<u>Efeito matriz e seletividade</u>	64
.3.2.5.3.4	<u>Robustez</u>	64
.3.2.5.4	<u>Aplicação do método espectrofotométrico miniaturizado desenvolvido e validado na análise dos ESFs</u>	64
.3.2.6	<u>Identificação dos ESFs por CCD</u>	65
.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
.4.1	Seleção e aquisição dos ESFs comerciais	67
.4.2	Preparo do ESF controle	71
.4.3	Determinação da umidade dos ESFs pelo método volumétrico ..	74
.4.4	Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs por CLAE-UV	76
.4.4.1	<u>Desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV</u>	76
.4.4.2	<u>Validação do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV</u>	81
.4.4.2.1	<u>Seletividade</u>	81
.4.4.2.2	<u>Linearidade da faixa de trabalho</u>	89
.4.4.2.3	<u>Efeito matriz</u>	93
.4.4.2.4	<u>Limites de quantificação e de detecção</u>	94
.4.4.2.5	<u>Precisão</u>	95
.4.4.2.6	<u>Exatidão</u>	96
.4.4.2.7	<u>Robustez e adequabilidade do sistema</u>	97

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

II.4.4.3	<u>Aplicação do método desenvolvido e validado na análise dos ESFs</u>	98
II.4.5	Determinação do teor de taninos totais nos ESFs por método espectrofotométrico miniaturizado	102
II.4.5.1	<u>Preparo das amostras e procedimento desenvolvido</u>	102
II.4.5.2	<u>Validação do método espectrofotométrico miniaturizado</u>	103
II.4.5.2.1	<i>Linearidade e limites de quantificação e de detecção</i>	103
II.4.5.2.2	<i>Precisão e exatidão</i>	104
II.4.5.2.3	<i>Efeito matriz e seletividade</i>	104
II.4.5.2.4	<i>Robustez</i>	106
II.4.5.3	<u>Aplicação do método espectrofotométrico miniaturizado desenvolvido e validado na análise dos ESFs</u>	107
II.4.5.4	<u>Comparação de custos do método tradicional farmacopeico com o método espectrofotométrico miniaturizado</u>	109
II.4.6	Identificação dos ESFs por CCD	112
II.5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	119
CAPÍTULO III – CONTROLE DE QUALIDADE BIOLÓGICO DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE <i>Punica granatum</i> L.: AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS		
III.1	INTRODUÇÃO	122
III.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	124
III.2.1	Atividade antibacteriana da <i>Punica granatum</i> L.	124
III.2.2	Atividade antioxidante da <i>Punica granatum</i> L.	127
III.2.3	Atividade anti-inflamatória da <i>Punica granatum</i> L.	129
III.3	MATERIAIS E MÉTODOS	133
III.3.1	Materiais	133

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

III.3.1.1	<u>Substâncias químicas de referência, ESFs e medicamentos</u>	133
III.3.1.2	<u>Cepas de bactérias</u>	133
III.3.1.3	<u>Equipamentos e instrumentos</u>	134
III.3.1.4	<u>Consumíveis e vidrarias</u>	134
III.3.1.5	<u>Reagentes e meios de cultura</u>	134
III.3.2	Métodos	135
III.3.2.1	<u>Avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs</u>	135
III.3.2.2	<u>Avaliação da atividade antioxidante dos ESFs</u>	137
III.3.2.3	<u>Avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs</u>	138
III.3.2.4	<u>Avaliação do impacto dos ESFs sobre a hemostasia</u>	140
III.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
III.4.1	Avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs	143
III.4.2	Avaliação da atividade antioxidante dos ESFs	149
III.4.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs	152
III.4.4	Avaliação do impacto dos ESFs sobre a hemostasia	156
III.5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	159
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS		
IV.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	162
IV.2	CONCLUSÃO	164
	REFERÊNCIAS	167
APÊNDICES		
	APÊNDICE A – Artigo submetido à <i>Current Analytical Chemistry</i>	189
	APÊNDICE B – Resumo enviado ao VI ABCF Congress	198

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

APÊNDICE C – Resumo enviado a XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.....	199
APÊNDICE D – Resumo enviado ao XII Congresso Mundial de Farmacêuticos da Língua Portuguesa.....	200
APÊNDICE E – Resumo enviado ao III Simpósio de Microbiologia da UFMG.....	201
APÊNDICE F – Resumo enviado a XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG.....	202
APÊNDICE G – Resumo enviado ao Congresso Nacional dos Farmacêuticos de 2015. Evento organizado pela Ordem dos Farmacêuticos de Portugal.....	203
APÊNDICE H – Resumo enviado a XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.....	204
APÊNDICE I – Resumo enviado a XXIV Semana de Iniciação Científica da UFMG.....	205
ANEXOS	
ANEXO A – Confirmação de submissão de artigo à <i>Current Analytical Chemistry</i>.....	207
ANEXO B – Certificado da CEUA para realização da avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos secos da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L.....	208
ANEXO C – Certificado do COEP para realização da avaliação do impacto de extratos secos da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L. sobre a hemostasia.....	209
ANEXO D – Certificado de apresentação de trabalho no VI ABCF Congress.....	210

/continua.

SUMÁRIO (conclusão)

ANEXO E – Certificado de trabalho premiado no VI ABCF Congress.....	211
ANEXO F – Certificado de apresentação de trabalho na XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.....	212
ANEXO G – Certificado de apresentação de trabalho no XII Congresso Mundial de Farmacêuticos da Língua Portuguesa.....	213
ANEXO H – Certificado de apresentação de trabalho no III Simpósio de Microbiologia da UFMG.....	214
ANEXO I – Certificado de apresentação de trabalho na XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG.....	215
ANEXO J – Certificado de apresentação de trabalho no Congresso Nacional dos Farmacêuticos de 2015. Evento organizado pela Ordem dos Farmacêuticos de Portugal.....	216
ANEXO K – Certificado de apresentação de trabalho na XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.....	217
ANEXO L – Certificado de apresentação de trabalho na XXIV Semana de Iniciação Científica da UFMG.....	218

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

1.1 INTRODUÇÃO

Há séculos, diversas partes da romãzeira (*Punica granatum* L.), também conhecida como pomegranate, vem sendo utilizadas no tratamento e na prevenção de diversas doenças, como diarreia, parasitoses, inflamações, proteção contra estresse oxidativo, dentre outras (LANTZOURAKI *et al.*, 2015; SHIRODE *et al.*, 2015). Nos últimos anos, seu uso e importância econômica foram ampliados, principalmente devido à disseminação do uso e à facilidade de aquisição do suco da polpa das sementes e de extratos secos da casca do fruto, juntamente com o aumento do número de relatos de benefícios e de propriedades terapêuticas relacionadas à ingestão desses produtos. Hoje, a romã está entre os 18 frutos mais consumidos no mundo, devido à sua intensa atividade antioxidante e ao seu grande potencial terapêutico. Além disso, é considerada um “super fruto”, assim como a amora, a framboesa, o mirtilo, dentre outras “berries” (LANTZOURAKI *et al.*, 2015; SHIRODE *et al.*, 2015; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015).

A utilização de extratos secos por indústrias e farmácias de manipulação é extremamente vantajosa, pois permite a aplicação na produção de diversas formas farmacêuticas, como cápsulas, sachês, pomadas, cremes, comprimidos, géis, dentre outras. Além da maior gama de possibilidades de usos, a retirada de líquidos dos extratos aumenta em muito a estabilidade dos constituintes químicos e minimiza o crescimento microbiano, prolongando a viabilidade do material (SILVA *et al.*, 2012).

As principais substâncias bioativas presentes na casca do fruto da *Punica granatum* L. são os elagitaninos, os quais são taninos hidrolisáveis, derivados do metabolismo do ácido gálico. Dentre eles, a punicalagina (PN) é o constituinte majoritário e característico da romã (VORA; LONDHE; PANDITA, 2015), estando presente também a punicalina, outro elagitanino, além de ácido gálico e ácido elágico (AE). Esse último está presente em baixas concentrações (menos que 5% (p/p) nos extratos secos da casca), mas pode ter seu teor levemente aumentado devido à ocorrência de hidrólise de taninos hidrolisáveis, como a punicalagina, durante etapas de processamento e extração (BORGES; CROZIER, 2012; MARTIN *et al.*, 2009; MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006).

É comum encontrar extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum* L. (ESFs) comerciais com características muito diferentes de extratos autênticos, produzidos sob condições controladas e sem adição de outras substâncias ou excipientes. Esses extratos vem sendo comercializados em farmácias de manipulação, farmácias *on line* ou mesmo em lojas físicas ou virtuais de produtos naturais (LANSKY, 2006; MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

A investigação da qualidade dos extratos comercializados atualmente, por meio da avaliação, comprovação e monitoramento do teor de marcadores ativos, das características físico-químicas, das atividades biológicas atribuídas a esses extratos e da segurança do uso via oral, é de grande interesse público e justificada por:

- a) interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) e reconhecimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como droga vegetal utilizada no país;
- b) ausência de monografias completas em farmacopeias e compêndios oficiais;
- c) baixo nível de controle de qualidade dos ESFs atualmente fornecidos pelas indústrias e comercializados;
- d) pouco embasamento teórico e científico disponível na literatura para padronização do extrato com teores elevados de apenas um marcador ativo;
- e) necessidade de melhor avaliação qualitativa e quantitativa dos marcadores ativos nos extratos e de sua eficácia para as finalidades terapêuticas propostas pelos fornecedores do produto.

I.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.2.1 *Punica granatum* L.

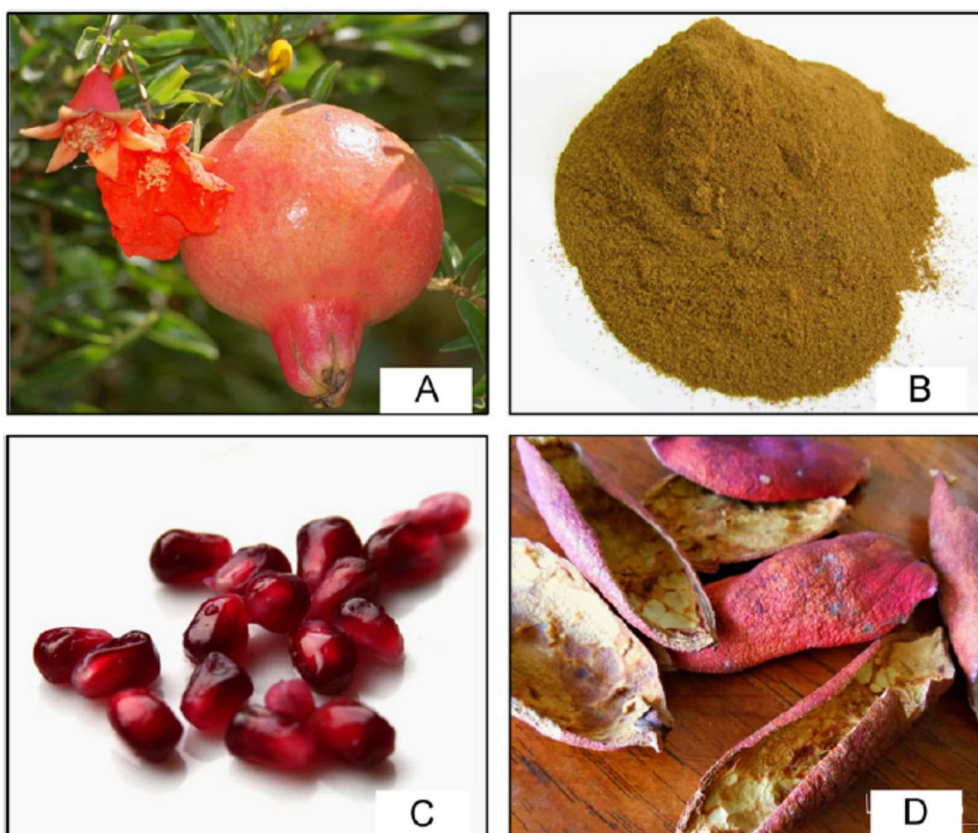
A *Punica granatum* L., popularmente conhecida no Brasil como romã, pertence à família Lythraceae, sendo também denominada como romãzeira, romeira, grenadier, pomegranate, milgrada, shiliupi e granada (BRANDÃO; BANDEIRA; ANDRADE, 2003; FARMACOPEIA, 1926; FORMULÁRIO, 2011; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012). Originária da Ásia, a romãzeira é cultivada em diversas regiões subtropicais e tropicais, com diferentes zonas microclimáticas, em todo o mundo, tais como Irã, Estados Unidos, Turquia, Egito, Itália, Índia, Chile e Espanha. A produção mundial de romã em 2014 foi estimada em cerca de 3 milhões de toneladas, sendo o Irã o principal produtor (47%). A exportação de romã do Irã vem aumentando significativamente nos últimos anos, evidenciando a crescente demanda por essa planta e pelos produtos derivados, seja por interesse alimentício (sementes, sucos, geleias e vinhos), ornamental (bonsais) ou medicinal (*in natura*, infusões, extratos, tinturas, óleo, etc). Embora a Espanha seja a maior fornecedora na Europa, sua produção corresponde a apenas um décimo da produção no Irã ou Índia. Nos Estados Unidos, o cultivo de romã também cresceu significativamente nos últimos anos, sendo a Califórnia detentora de 99% das áreas de plantio. A parte mais utilizada com finalidade terapêutica é a casca do fruto (pericarpo), juntamente com o mesocarpo (BRANDÃO; BANDEIRA; ANDRADE, 2003; FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011; MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; SEERAM; SCHULMAN; HEBER, 2006; ZHANG *et al.*, 2009; KAHRAMANOGLU; USANMAZ, 2016).

A *Punica granatum* L. é usada desde o Antigo Egito (3.500 A.C.), como fortificante para coração, no tratamento de infecções e inflamações de garganta, tosses, diarreias, verminoses intestinais, diabetes, placa dentária, infertilidade e inflamações de um modo geral, sendo vista como símbolo de prosperidade, fertilidade e força na Medicina Tradicional Chinesa e na Antiga Pérsia. No cristianismo, a romã é frequentemente encontrada em decorações religiosas como símbolo de plenitude e da ressurreição de Jesus. Essa planta foi levada pelos fenícios para o Mediterrâneo,

chegando ao Brasil através dos portugueses. Desde a antiguidade vem sendo usada também na culinária devido ao seu sabor característico, apresentando muitas aplicações místicas, simbólicas e ornamentais, como consequência de sua beleza e aparência (BRANDÃO; BANDEIRA; ANDRADE, 2003; CORRÊA; PENNA, 1926; DEY *et al.*, 2012; FARMACOPEIA, 1926; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; JURENKA, 2008; LOPES *et al.*, 2001; SEERAM; SCHULMAN; HEBER, 2006).

A romãzeira, uma árvore frutífera, é um arbusto ereto, ramificado, de pequeno porte e com altura entre 2 a 5 metros. Seus ramos revestem-se, quando jovens, de cascas avermelhadas, que se tornam acinzentadas nos ramos adultos e no tronco. As folhas são opostas e fasciculadas, obtusas, brilhantes, alternadas e em grupos de 2 ou 3, com 2 a 8 cm de comprimento. As flores são terminais, agrupadas de 1 a 5, com cálix suculento, parcialmente tubular e com 5 a 7 pétalas separadas, enrugadas e de cor vermelho-alaranjada. Os frutos são arredondados, tendo de 5 a 12 cm de diâmetro, com casca grossa coriácea amarela e com manchas verdes no fruto jovem ou vermelhas no fruto maduro, os quais arrebetam expondo várias lojas cheias de sementes (200 a 1400) recobertas por mucilagem avermelhada de sabor agradável, adocicado, adstringente e ácido (**Figura 1**) (BRANDÃO; BANDEIRA; ANDRADE, 2003; CORRÊA; PENNA, 1926; FARMACOPEIA, 1926; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; LOPES *et al.*, 2001; SEERAM; SCHULMAN; HEBER, 2006).

Figura 1 – Fruto da *Punica granatum* L. (A) e suas frações: extrato seco da casca (B), sementes (C) e casca dessecada (D).

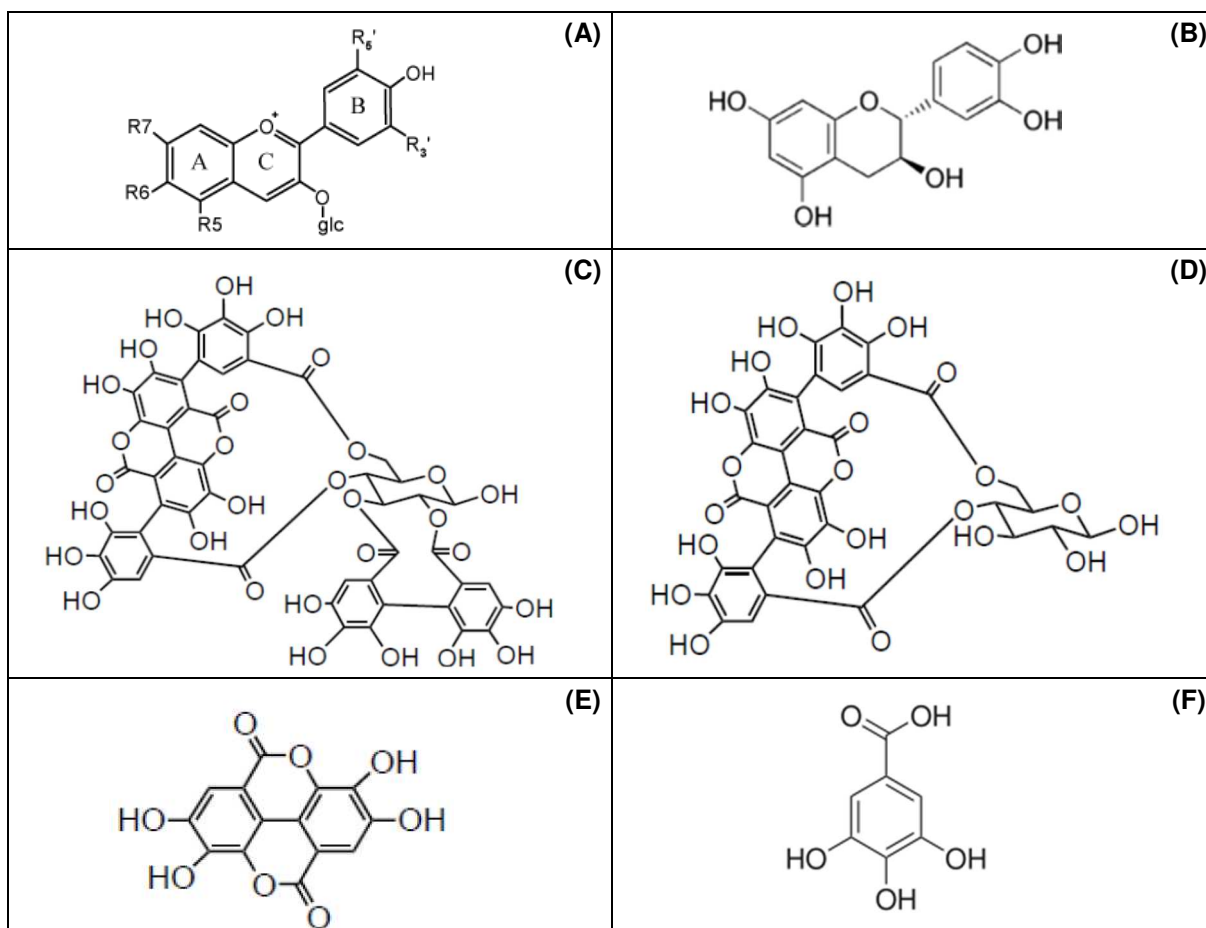


Fonte: ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012

1.2.2 Composição fitoquímica

Na casca e no mesocarpo do fruto da *Punica granatum* L. estão concentrados compostos fenólicos, como taninos hidrolisáveis gálicos e elágicos (punicalina, punicalagina, dentre outros) e flavonoides complexos (antocianinas e catequinas), responsáveis por 92% da atividade antioxidante associada à fruta, além das propriedades organolépticas como cor e adstringência (**Figura 2**). A enorme possibilidade de combinações de monômeros dá origem a diversos taninos, os quais são divididos em dois grupos: galotaninos e elagitaninos, sendo a punicalagina o principal representante desse último grupo (BORGES; CROZIER, 2012; FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; MARCHI *et al.*, 2015; MENA *et al.*, 2012; MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; SHIRODE *et al.*, 2015; SREEKUMAR *et al.*, 2014; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015).

Figura 2 – Estrutura química dos principais compostos fenólicos da casca do fruto de *Punica granatum* L.: antocianinas (A), catequina (B), punicalagina (C), punicalina (D), ácido elágico (E) e ácido gálico (F).



Fonte: FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011; MENA *et al.*, 2012

1.2.3 Atividades biológicas e comercialização em farmácias magistrais

Atualmente, além da ação antioxidante, diversas outras atividades biológicas são associadas aos ESFs, mesmo que ainda não tenham sido completamente estudados e que os mecanismos de ação ainda não estejam completamente estabelecidos para todas as atividades. As principais atividades biológicas dos ESFs indicadas na literatura são:

- atividade antibacteriana contra alguns patógenos, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*;
- proteção cardiovascular com redução da pressão arterial e do risco de aterosclerose por meio da inibição da oxidação do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade);

- c) atividade antitumoral em câncer de próstata, cólon, pele, mama, dentre outros, por meio da ação antioxidante (redução de radicais livres), inibição da proliferação celular e indução de apoptose de células cancerosas;
- d) atividade anti-inflamatória por inibição da ciclooxigenase (COX), redução da produção de óxido nítrico e de prostaglandinas;
- e) atividade antimalárica;
- f) atividade anti-helmíntica;
- g) atividade neuroprotetora;
- h) atividade hepatoprotetora;
- i) atividade antidiabética;
- j) redução da obesidade e da síndrome metabólica;
- k) redução da disfunção erétil e da infertilidade masculina;
- l) prevenção e tratamento da osteoporose (FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; JURENKA, 2008; MENA *et al.*, 2012; MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; SREEKUMAR *et al.*, 2014).

Além dessas atividades biológicas, os produtos contendo ESFs comercializados em farmácias magistrais possuem diversas outras indicações “*off label*”, tais como:

- a) emagrecimento;
- b) prevenção e combate de rugas e marcas de expressão;
- c) melhora no aspecto geral da pele com aumento da hidratação e maciez;
- d) clareamento de manchas de pele (hipercromias melanodérmicas);
- e) tratamento de acne e seborreia, regulando oleosidade da pele e dos cabelos;
- f) fortalecimento do sistema imunológico;
- g) diminuição dos sintomas da menopausa (ação estrogênica) (ACÁCIA, 2018; DERMO MANIPULACOES, 2018; LEMNIS, 2018; PHARMA ART, 2018; QUÍRON, 2018; RELVA VERDE, 2018).

A maioria dessas indicações não tem comprovação científica, sendo utilizadas, muitas vezes, apenas como estratégia de marketing. Os ESFs são comercializados sob a forma de pó ou cápsulas contendo de 200 a 500 mg para uso oral e o preço é bastante variável entre os diferentes produtores. A comercialização é feita de forma livre, sem necessidade de prescrição médica, sendo muito frequente o comércio virtual em sites de farmácias de manipulação ou de empresas de produtos naturais, o que favorece a

utilização indiscriminada dos produtos a base de ESFs (ACÁCIA, 2018; DERMO MANIPULACOES, 2018; LEMNIS, 2018; PHARMA ART, 2018; QUÍRON, 2018; RELVA VERDE, 2018).

1.2.4 Aspectos regulatórios

Embora o uso da romã *in natura* ou em fitoterápicos, como extratos fluidos (alcoólicos ou hidroalcoólicos), extrato seco, tintura, creme, pomada, shampoo, gel, decocto, infusão, óleo ou essência, seja amplamente divulgado, é escassa a literatura oficial relacionada a esse vegetal.

Foi encontrada monografia para a *Punica granatum* L. apenas na Farmacopeia Brasileira 1ª edição (1926), mas tendo como parte utilizada a casca do caule e da raiz, e não a casca dos frutos, parte da romãzeira mais utilizada atualmente. Além disso, a especificação de teor é expressa em relação a alcaloides, e não em relação a taninos ou flavonoides. Dentre os compêndios oficiais atuais do Brasil, apenas o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 1ª edição possui monografia para a *Punica granatum* L., não havendo monografias no Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira 1ª edição ou na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). A monografia presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 1ª edição recomenda a utilização da planta apenas na forma de infusão ou tintura da casca do fruto seca, para bochecho e gargarejo, devido à sua ação anti-inflamatória e antibacteriana. Já na literatura oficial internacional há monografia para a *Punica granatum* L. apenas no *WHO monographs on selected medicinal plants – Volume 4*, da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*). Entretanto, a monografia é para o pericarpo seco e não para o ESF.

Além disso, *Punica granatum* L. consta também na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS de 2009 (RENISUS – 2009) e no Anexo I da resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010 da ANVISA, que contém a relação de drogas vegetais regulamentadas pela ANVISA no país. A forma de utilização em ambas as referências também é aplicação do decocto da casca do fruto na forma de bochechos

e gargarejos. Não há nenhum documento oficial no país com orientações para o uso oral de ESFs.

1.2.5 Farmacocinética e biodisponibilidade dos marcadores vegetais ativos

A punicalagina e outros elagitaninos, devido ao tamanho molecular elevado, não são absorvidos diretamente pelo organismo. Entretanto, a punicalagina sofre hidrólise lenta no trato gastrointestinal por várias horas após a administração, levando a níveis sustentados de ácido elágico durante 6 horas. Esse ácido, por sua vez, é absorvido na primeira porção do trato gastrointestinal, sendo gradualmente metabolizado no intestino por até aproximadamente 12 horas, desde o jejuno até as partes mais distais, originando as urolitinas A, B, C e D, as quais podem ser detectadas no sangue e na urina até 48 horas após a administração de uma dose única do ESF. Já a administração direta do ácido elágico via oral leva a uma baixa absorção e rápida metabolização e eliminação, atingindo a concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) em apenas 30 minutos (MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2009; MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2009).

Desse modo, a presença de outros taninos hidrolisáveis, como a punicalagina, que após administração oral são convertidos em ácido elágico, pode justificar a preferência em relação ao uso do produto fitoterápico frente a formulações contendo o ácido elágico isolado ou em concentrações elevadas. Além disso, em geral, é comum haver maior biodisponibilidade de marcadores vegetais no produto fitoterápico quando comparada à administração isolada dos marcadores, provavelmente como consequência da ação sinérgica de outros compostos presentes na matriz vegetal (JURENKA, 2008; LI *et al.*, 2012; MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009).

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 Objetivo geral

Realizar o controle de qualidade físico-químico e biológico de ESFs comercializados em farmácias magistrais, avaliando o impacto da composição dos extratos sobre as atividades biológicas.

I.3.2 Objetivos específicos

- a) Obter ESFs comerciais representativos da variabilidade existente no mercado;
- b) produzir um ESF controle por extração a partir da casca do fruto seca e pulverizada;
- c) realizar o controle de qualidade físico-químico dos ESFs, por meio de ensaios para determinação de suas características físico-químicas e do teor dos marcadores ativos;
- d) realizar o controle de qualidade biológico dos ESFs, por meio de ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* para avaliação comparativa de algumas das atividades biológicas atribuídas à esses produtos;
- e) avaliar a existência de sinergismo entre o ácido elágico e/ou a punicalagina e outros componentes dos ESFs nos ensaios biológicos, por meio da comparação dos resultados obtidos para os padrões e para os ESFs.



CAPÍTULO II

CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE *Punica granatum* L.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

II.1 INTRODUÇÃO

A produção, comercialização e aceitação de fitoterápicos pela comunidade médica e pelos pacientes vem crescendo progressivamente nos últimos anos no mundo inteiro, e refletindo também no mercado brasileiro. Entretanto, as deficiências na qualidade e no rigor da fiscalização desses produtos, desde a produção até a venda, não tem acompanhado o aumento no número de fitoterápicos disponíveis para a população, de modo que a qualidade e a uniformidade entre lotes e marcas é, muitas vezes, inadequada (CALIXTO, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2005; WU e TIAN, 2017).

Outro fator agravante para a dificuldade de controle de qualidade adequado para esses produtos consiste na grande escassez de métodos e especificações em compêndios oficiais, além do número ainda baixo de padrões de marcadores disponíveis para muitas espécies de plantas. O controle de qualidade de um fitoterápico envolve várias etapas que vão desde o cultivo e obtenção da matéria-prima vegetal (Boas Práticas Agrícolas), passando por todo o processo de produção, até a análise do produto final (Boas Práticas de Fabricação e Controle). No Brasil, as Boas Práticas Agrícolas são controladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não sendo de responsabilidade da ANVISA, a qual controla a qualidade de fitoterápicos a partir do processo de produção (BRASIL, 2014b; FARIAS, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Para os ESFs comercializados atualmente, características físicas, como a cor, e fitoquímicas, como o teor de ácido elágico e de outros taninos, são extremamente variáveis, o que pode ser um indício de processo de produção inadequado ou mesmo de adulteração (LANSKY, 2006; MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Por isso, a realização do controle de qualidade físico-químico dos ESFs, por meio de ensaios para determinação de suas características físico-químicas e do teor dos marcadores ativos, como a punicalagina e o ácido elágico, é um importante meio para controle da qualidade desses produtos, assegurando que foram produzidos a partir da *Punica granatum* L. e que não houve adulteração através da adição de ácido elágico ou de outras substâncias e excipientes em excesso ao extrato (MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009).

II.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os testes de controle de qualidade para produtos fitoterápicos devem permitir a determinação qualitativa e quantitativa das substâncias ativas, no caso de haver marcador conhecido para a atividade terapêutica atribuída ao produto. A obtenção de perfis cromatográficos é uma ferramenta muito importante para identificação e quantificação desses marcadores, auxiliando na verificação de adulterações de extratos vegetais (BRASIL, 2014b; EMA, 2011). A Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados (COFID) da Gerência Geral de Medicamentos (GGMED) da ANVISA recomenda que os principais pontos a serem avaliados na determinação da equivalência de extratos são: o tipo de extrato, solventes extratores, método de extração, relação droga/derivado vegetal, teor dos marcadores e perfil cromatográfico. Quanto mais semelhantes forem essas informações entre os extratos analisados, mais segura é a confirmação da equivalência. A avaliação entre lotes também é fundamental, já que é comum a existência de diferenças significativas entre lotes de um mesmo produto (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b; BRASIL, 2014c).

II.2.1 Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV

A utilização de métodos espectrométricos é de extrema importância para o controle de qualidade de fitoterápicos de um modo geral. Entretanto, métodos por espectrofotometria de absorção na região do UV possuem, muitas vezes, problemas relacionados à seletividade, como uma limitação intrínseca ao método. Isso porque substâncias estruturalmente relacionadas, que coexistem na matriz, como metabólitos naturais de mesma classe fitoquímica e impurezas, possuem cromóforos muito semelhantes com absorvidades próximas, podendo interferir na análise (LOUGH e WAINER, 1995; SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores espectrofotométricos na região do UV (CLAE-UV) ou a detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) ganhou ampla aplicação qualitativa e quantitativa nas mais diversas áreas, devido principalmente à sua capacidade de separar constituintes em uma mistura,

umentando a seletividade na detecção. O uso de detectores PDA, que possibilitam a realização de varreduras da absorção da amostra durante a análise em amplas faixas, aumenta ainda mais a capacidade de identificação específica da substância de interesse, já que pode ser escolhido o ponto de absorção mais seletivo. Outras vantagens da CLAE-UV são o aumento da sensibilidade do método e a possibilidade de analisar substâncias termicamente instáveis (LOUGH e WAINER, 1995; SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997; TONHI *et al.*, 2002).

As estratégias para alcance de condições ideais de separação cromatográfica e seletividade baseiam-se no ajuste de parâmetros como: coluna, fase móvel, fluxo, temperatura, comprimento de onda, dentre outros. Um dos fatores de maior impacto sobre a retenção de analitos é a coluna cromatográfica. Modificações no tipo de fase estacionária, comprimento, diâmetro interno, tipo e tamanho de partícula, podem levar a obtenção de cromatogramas completamente diferentes para uma mesma amostra. O impacto da composição da fase estacionária é tão significativo, que colunas de mesmo fabricante, mas de lotes distintos podem levar a uma variação expressiva no resultado, dependendo dos analitos presentes na amostra (DOLAN *et al.*, 2002; MARCHAND *et al.*, 2005; LOUGH e WAINER, 1995; SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997; TONHI *et al.*, 2002).

Na CLAE-UV, o modo de separação mais comum e utilizado é a separação em fase reversa, pois grande parte dos analitos de interesse na área farmacêutica e outras áreas possuem polaridade variando de intermediária a baixa. Entretanto, para retenção e separação de substâncias polares, como muitos fitoquímicos, pode ser necessário o uso de outros mecanismos de separação, como a fase normal e a *Hydrophilic interaction chromatography* (HILIC) (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

Vários métodos analíticos e bioanalíticos por CLAE para identificação e/ou quantificação isolada ou simultânea de ácido elágico ou punicalagina em produtos derivados da *Punica granatum* L. e em matrizes biológicas estão descritos na literatura, havendo uma enorme variedade nas condições de análise e, conseqüentemente, nos resultados cromatográficos obtidos. Há relatos do uso de

detectores espectrofotométricos (UV-visível), fluorimétricos, eletroquímicos e espectrômetros de massas. Em geral, foram utilizadas colunas cromatográficas empacotadas com sílica ligada a grupos octadecilsilano (C₁₈). Entretanto, alguns autores relataram dificuldades na obtenção de fatores de retenção adequados e separação para os constituintes dos produtos analisados, principalmente para taninos hidrolisáveis (BALA *et al.*, 2006; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015). Também foi verificada a grande sensibilidade dos analitos a variações mínimas nas características das colunas, como tipo de partícula, modo de revestimento e origem, havendo grande impacto sobre a retenção e intensidade dos picos (BALA *et al.*, 2006).

Na maior parte dos métodos, foi utilizada uma fase móvel ácida, sendo o modo de eluição variável entre isocrático ou em gradiente. Os comprimentos de onda utilizados nos estudos foram, em geral, semelhantes. Em muitos artigos, a condição final obtida após o desenvolvimento do método não foi muito adequada para a separação de todas as substâncias, havendo apenas a suposição da identidade dos picos. Na **Tabela 1** estão resumidas as principais condições cromatográficas dos métodos mais relevantes descritos na literatura para quantificação de ácido elágico e/ou punicalagina por CLAE-UV em produtos derivados da *Punica granatum* L.

Tabela 1 – Resumos das condições dos métodos cromatográficos mais relevantes descritos na literatura para quantificação de ácido elágico e/ou punicalagina por CLAE-UV em produtos derivados da *Punica granatum* L.

Referência	Marcador	Coluna	Fase Móvel	Comprimento de onda
BALA <i>et al.</i> , 2006	AE	PEG, 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:tampão fosfato de potássio 5 mM pH 2,5 (80:20, v/v)	254 nm
ZHOU <i>et al.</i> , 2008	AE	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:acetato de etila:tampão fosfato de potássio 5 mM+ácido fosfórico 5 mM (34:2:64, v/v)	254 nm
WANG <i>et al.</i> , 2013	AE	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido fosfórico 0,2% (gradiente)	254 nm
MO <i>et al.</i> , 2013	AE	C ₁₈ , 150 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:ácido acético 2% (gradiente)	254 nm
AMYRGIALAKI <i>et al.</i> , 2014	AE	C ₁₈ , 125 x 2 mm, 4 µm	Metanol:ácido acético 2,5% (gradiente)	230 a 440 nm
AQIL <i>et al.</i> , 2012	PN	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Ácido acético 2% em metanol:ácido acético 2% em água (gradiente)	378 nm - 200 a 400 nm
ROMANI; CAMPO; PINELLI, 2012	PN	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido fórmico pH 3,2 (gradiente)	254 e 366 nm
SANTIAGO <i>et al.</i> , 2014	PN	C ₁₈ , 100 x 4,6 mm, 2,4 µm	Acetonitrila:ácido fórmico 1% (gradiente)	260 nm
SEERAM <i>et al.</i> , 2005	AE e PN	C ₁₈ , 150 x 3,9 mm, 5 µm	Ácido acético 2% em metanol:ácido acético 2% em água (gradiente)	254 nm (todos), 378 nm (PN) 366 nm (AE)
ZHANG <i>et al.</i> , 2009	AE e PN	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido fosfórico 0,4% (gradiente)	360 nm
ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010	AE e PN	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido fosfórico 3,5% (gradiente)	220 a 400 nm
BANERJEE <i>et al.</i> , 2012	AE e PN	C ₁₈ , 250 x 4,8 mm, 5 µm	Acetonitrila/água/ácido acético (68:30:2, v/v):água/ácido acético (98:2, v/v) (gradiente)	280 e 520 nm
BORGES; CROZIER, 2012	AE e PN	C ₆ -fenila, 250 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:ácido fórmico 1% (gradiente)	200 a 600 nm
ÇAM; İÇYER, 2013	AE e PN	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:água/ácido acético (98:2, v/v) (gradiente)	365 e 378 nm, 200 a 800 nm
GÓMEZ-CARAVACA <i>et al.</i> , 2013	AE e PN	C ₁₈ , 100 x 3,0 mm, 2,7 µm	Acetonitrila:ácido acético 1% (gradiente)	280 e 360 nm, 210 a 600 nm
MIDDHA; USHA; PANDE, 2013	AE e PN	C ₈ , 100 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:ácido fosfórico 0,1 (50:50, v/v)	220, 240, 260, 270 e 280 nm
SENTANDREU; CERDÁN-CALERO, SENDRA, 2013	AE e PN	C ₁₈ , 250 x 2,1 mm, 3 µm	Água/THF/ácido fórmico (97,5:2,0:0,5, v/v): acetoneitrila/THF/ácido fórmico (97,5:2,0:0,5, v/v) (gradiente)	280, 320 e 520 nm

AE: ácido elágico. CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector espectrofotométrico na região do ultravioleta. PN: punicalagina.

II.2.2 Determinação do teor de taninos totais em ESFs por espectrofotometria de absorção na região do UV-visível

Diversos métodos aplicando diferentes técnicas com foco na quantificação de taninos em produtos naturais podem ser encontrados na literatura (SCALBERT, 1992). Alguns exemplos são métodos colorimétricos/espectrofotométricos, gravimétricos e turbidimétricos, ensaios baseados em precipitação, mudanças de atividade enzimática ou inibição do crescimento microbiano, métodos usando espectrometria de massas do tipo *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) ou fast-atom bombardment (FAB-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (CLAE) com vários métodos de detecção (ultravioleta - UV, detector de arranjo de diodos - DAD, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear - RMN, eletroquímica, fluorescência, hidrólise química), cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) e eletroforese capilar de zona (CZE) (AMORIM *et al.*, 2008; HEIL *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2012; MATEI *et al.*, 2016; SCHOFIELD *et al.*, 2001; SEDDON; DOWNEY, 2008).

Métodos colorimétricos, que utilizam reagente de Folin-Ciocalteu para quantificação de polifenóis, são preconizados por referências oficiais, como a Farmacopeia Brasileira, a Farmacopeia Europeia e a Farmacopeia Americana. Esses métodos são baseados em reações de oxirredução com formação de complexo de cor azul com absorção máxima na região do espectro visível (DICIAULA *et al.*, 2014; SCALBERT, 1992).

Em relação à quantificação de taninos totais em produtos naturais derivados da *Punica granatum* L., também há diversos métodos descritos na literatura, tais como: ensaios colorimétricos/espectrofotométricos e titulométricos (ABID *et al.*, 2017; AMRI *et al.*, 2017; BEKIR *et al.*, 2013; DEWI *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2007; MPHAHLELE *et al.*, 2016; ORAK; YAGAR; ISBILIR, 2012; SAFFARZADEH-MATIN e KHOSROSHAHI *et al.*, 2017) e métodos usando CLAE com detecção UV ou MS (BRIGHENTI *et al.*, 2017; FISCHER *et al.*, 2013; GALEGO *et al.*, 2013; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2013; MUHACIR-GÜZEL *et al.*, 2014).

II.2.3 Identificação de ESFs por CCD

A cromatografia consiste em uma técnica físico-química para separação rápida de substâncias presentes em soluções ou em matrizes complexas, permitindo a análise qualitativa ou quantitativa, dependendo do tipo de cromatografia. O princípio da separação fundamenta-se na migração diferencial das substâncias que compõem a mistura devido a diferentes interações com duas fases imiscíveis: a fase móvel líquida, no caso da cromatografia em camada delgada (CCD), e a fase estacionária, que é fixa a um suporte. Embora com os avanços tecnológicos existam outros tipos de fases estacionárias para CCD, a sílica gel ainda é a mais utilizada (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FARMACOPEIA, 2010; KUMAR; JYOTIRMAYEE; SARANGI, 2013).

O uso difundido da CCD para o acompanhamento de reações orgânicas, purificação e isolamento de substâncias, e na avaliação da composição de diversos produtos químicos e farmacêuticos em análises qualitativas ou semiquantitativas, ocorre por se tratar de uma técnica simples, rápida, visual, eficaz e de baixo custo. Essas características fazem com que o emprego da CCD no controle de qualidade de extratos de plantas medicinais seja muito comum em laboratórios e indústrias, podendo ainda ser facilmente aplicada por distribuidoras e farmácias de manipulação (ALVES *et al.*, 2011; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FARMACOPEIA, 2010; KUMAR; JYOTIRMAYEE; SARANGI, 2013; WAGNER; BLADT, 2009; WHO, 2011).

Entretanto, não há muitos métodos descritos na literatura científica para identificação de ácido elágico ou punicalagina em produtos derivados da *Punica granatum* L. utilizando a CCD. Dentre os métodos encontrados, as condições de análise são extremamente variáveis e, em muitos casos, a descrição é incompleta, dificultando a reprodução do método (FOSS *et al.*, 2014; HANU; HARMANPREET, 2012; HOLETZ *et al.*, 2002; SANGEETHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

Outro problema está na confiança em relação às conclusões emitidas, pois, em geral, não foram utilizados padrões dos marcadores como comparação para assegurar a identidade das manchas, havendo apenas uma suposição sobre a composição dos produtos analisados. Apenas Fakhri, Petróczi e Naughton (2014) identificaram o ácido

elágico por comparação com o padrão. Foss *et al.* (2014), Hanu e Harmanpreet (2012), Kulkarni, Aradhya e Divakar (2004) e Machado *et al.* (2002) utilizaram a CCD para monitorar o processo de isolamento da punicalagina e identificá-la ao final da extração. Entretanto, não utilizaram padrão para comparação dos resultados. Machado *et al.* (2002) e Foss *et al.* (2014) utilizaram outras técnicas (espectroscópicas e espectrofotométricas) para complementar a identificação. Na **Tabela 2** estão resumidas as principais condições dos métodos descritos na literatura para identificação do perfil cromatográfico por CCD de produtos derivados da *Punica granatum* L. e de marcadores desses produtos.

Tabela 2 – Resumo das condições dos métodos de identificação descritos na literatura para identificação por CCD do perfil cromatográfico de produtos derivados da *Punica granatum* L. e de marcadores desses produtos.

Referência	Marcador identificado	Comparação com padrão?	Fase estacionária	Fase Móvel	Revelador
HOLETZ <i>et al.</i> , 2002	-	Não	Sílica gel 60 GF ₂₅₄	Clorofórmio:metanol:água (65:35:5, v/v/v)	254 e 366 nm e Ácido sulfúrico
SANGEETHA; VIJAYALAKSHMI, 2012	-	Não	Sílica gel 60 GF ₂₅₄	Tolueno:acetato de etila (8:2, v/v)	254 e 366 nm e vanilina:ácido sulfúrico. Aquecimento a 105 °C.
FAKHRI; PETRÓCZI; NAUGHTON, 2014	Ácido elágico	Sim	Sílica gel 60 GF ₂₅₄	Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (60:40:10, v/v/v)	2-aminoetil diphenilborinato 1% em metanol e polietilenoglicol (PEG) 5% em etanol. 366 nm.
MACHADO <i>et al.</i> , 2002	Punicalagina	Não	Celulose	Água:ácido acético (4:1, v/v)	Nitrito de sódio
KULKARNI; ARADHYA; DIVAKAR, 2004	Punicalagina	Não	Sílica gel	Clorofórmio:metanol (diferentes proporções)	Iodina
HANU; HARMANPREET, 2012	Punicalagina	Não	-	Clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico:metanol (4:5,2:0,6:0,2, v/v/v/v)	Anisaldeído:ácido acético glacial:metanol:ácido sulfúrico concentrado (0,5:9,5:85:5, v/v). Aquecimento a 110 °C
FOSS <i>et al.</i> , 2014	Punicalagina	Não	-	n-butanol:ácido acético:água (40:10:50, v/v/v) (parte superior)	Nenhum (cor natural)

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1 Materiais

II.3.1.1 Substâncias químicas de referência, ESFs e excipientes

Foram utilizadas as seguintes substâncias químicas de referência, amostras e excipientes:

- a) ácido ascórbico, 99,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- b) ácido elágico, 97,9% (Chromadex™);
- c) ácido gálico, 98,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- d) ácido tânico, 98,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- e) amido, 93,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- f) catequina, 96,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- g) ESF controle (19);
- h) ESFs comerciais (1 a 18);
- i) maltodextrina, 95,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- j) punicalagina, 96,3% (Chromadex™);
- k) pirogalol, 99,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- l) uracila, 99,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

II.3.1.2 Equipamentos e instrumentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos e instrumentos:

- a) agitador IKA®KS 260 Control, IKA®;
- b) balança analítica BP211 D, Sartorius;
- c) banho maria TecVap TE-0194, TECNAL;
- d) bomba de vácuo ME 2, VACUUBRAND;
- e) capela de exaustão, QUIMIS®;
- f) concentrador de amostras TecVap TE-0194, TECNAL;
- g) concentrador Plus a vácuo, Eppendorf;
- h) espectrofotômetro para microplacas VersaMax™, Molecular Devices;

- i) espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu;
- j) evaporador rotativo TE211, TECNAL;
- k) liofilizador K105, LIOTOP;
- l) micropipetador automático HandyStep®, Brand®;
- m) miniprocessador HC3IT, Black&Decker;
- n) sistema CLAE-EM/EM Quattro LC, Waters;
- o) sistema CLAE-UV 1200, Agilent;
- p) sistema CLAE-UV Surveyor Plus™, Thermo Scientific;
- q) sistema CLUE-UV Acquity UPLC, Waters;
- r) sistema de purificação de água Direct-Q, Millipore;
- s) titulador automático 785 DMP Titrino, Metrohm.

II.3.1.3 Consumíveis e vidrarias

Foram utilizados os seguintes consumíveis e vidrarias:

- a) béquer de 1L;
- b) capilar de vidro de 10 µL;
- c) coluna cromatográfica ACE® C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) – ACE®;
- d) coluna cromatográfica Zorbax® CN (150 × 4,6 mm, 5 µm) – Agilent;
- e) coluna cromatográfica Zorbax® Eclipse Plus C18 (100 mm × 4,6 mm, 5 µm) – Agilent;
- f) coluna cromatográfica LiChrospher® C18 (250 mm × 4 mm, 5 µm) – Merck Millipore®;
- g) coluna cromatográfica Purospher™ STAR NH₂ (250 mm × 4 mm, 5 µm) – Merck Millipore®;
- h) coluna cromatográfica SeQuant® ZIC®-pHILIC (100 mm × 4,6 mm, 5 µm) – Merck Millipore®;
- i) coluna cromatográfica Kinetex® C18 (100 mm × 3 mm, 1,7 µm) – Phenomenex;
- j) cuba de vidro para CCD;
- k) dessecador de vidro;
- l) filtros para seringa de celulose regenerada e reforçada com tamanho de poro de 0,45 µm;
- m) frascos de vidro para liofilização com rolha de borracha;

- n) membrana de celulose regenerada para filtração com poros de 0,45 µm;
- o) nitrogênio líquido;
- p) papel alumínio;
- q) parafilm® “M”;
- r) placas de alumínio revestidas com Sílica Gel 60 F₂₅₄ para CCD;
- s) placas de alumínio revestidas com Sílica Gel 60 RP18 F₂₅₄ para CCD;
- t) seringas de plástico de 10 mL.

||3.1.4 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) acetato de etila, 99,8% (Labsynth Ltda);
- b) acetonitrila, 99,9% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- c) ácido acético glacial, 99,7% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- d) ácido clorídrico, 37,0% (Labsynth Ltda);
- e) ácido fórmico, 99,8% (Merck Brasil Ltda);
- f) água ultrapura;
- g) álcool etílico absoluto, 99,5% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- h) carbonato de sódio anidro, 99,5% (Merck Brasil Ltda);
- i) cloreto de ferro, 98,0% (Labsynth Ltda);
- j) fosfato de sódio, 99,0% (Merck Brasil Ltda);
- k) hexano, 95,0% (Labsynth Ltda);
- l) hidróxido de sódio, 99,9% (Merck Brasil Ltda);
- m) isopropanol, 99,7% (Labsynth Ltda);
- n) metanol anidro, 99,9% (Merck Brasil Ltda);
- o) metanol, 99,9% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda e JTBaker Ltda);
- p) nitrito de sódio, 97,0% (Merck Brasil Ltda);
- q) peróxido de hidrogênio, 30,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- r) pó de pele (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- s) reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- t) reagente de Karl Fischer (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- u) tetrabutilamônio de potássio, 98,0% (Merck Brasil Ltda);
- v) tolueno, 99,9% (Labsynth Ltda).

||.3.2 Métodos

Todos os ensaios de controle de qualidade, bem como o preparo do extrato controle, foram realizados no laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

||.3.2.1 Seleção e aquisição dos ESFs comerciais

Para seleção dos extratos comerciais, foi realizado um amplo levantamento sobre os veículos de disponibilização dos mesmos para a população. No comércio virtual, como em sites de produtos naturais e de farmácias, e em lojas físicas de produtos naturais é comum encontrar o ESF em produtos compostos, juntamente com outros extratos ou substâncias isoladas e/ou sintéticas. Considerando que o objetivo com a realização do trabalho foi estudar exclusivamente os ESFs, optou-se por selecionar apenas indústrias de fitoterápicos, distribuidoras e farmácias de manipulação, onde são vendidas cápsulas contendo apenas o ESF.

Desse modo, buscou-se contatar indústrias e distribuidoras nacionais e internacionais, além de farmácias de manipulação em Belo Horizonte, com o objetivo de obter, no mínimo, 10 amostras de fontes distintas. Para as empresas que produziam os extratos, foi enviada por e-mail uma breve descrição dos objetivos do projeto e uma carta solicitando a doação de aproximadamente 10 g de ESF com uma cópia do laudo do fornecedor/produtor.

Após coleta e recebimento de todos os extratos doados por farmácias de manipulação e indústrias, foi realizada a identificação e o acondicionamento de cada extrato em frascos brancos de polietileno com tampa de pressão e vedação com parafilm® "M" para proteção da luz e da umidade. Os extratos foram classificados e numerados de acordo com o teor de ácido elágico ou de taninos totais declarado nos laudos para manter o sigilo em relação às empresas que colaboraram com a doação dos extratos. Todos os extratos foram acondicionados em dessecador de vidro.

II.3.2.2 Preparo do ESF controle

Os extratos comerciais adquiridos foram oriundos de diferentes produtores e de diferentes regiões do mundo, havendo uma diversidade intrínseca a características do modo de produção, como, por exemplo, temperatura e tipos e quantidades de excipientes usados. Considerando isso, foi produzido um extrato na Faculdade de Farmácia da UFMG para ser utilizado como controle e comparação em todos os estudos com os extratos comerciais.

O extrato foi produzido a partir da casca de frutos de uma romãzeira do Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (FZB-BH). A espécie (*Punica granatum* L. - Lythraceae) foi registrada no herbário da FZB-BH: *BHZB 11.145*, *Coletor: Ordones, J. 2261*, após coleta em janeiro de 2015. O método de preparo foi desenvolvido a partir de informações obtidas na literatura e nos laudos dos fornecedores, considerando as condições disponíveis para execução do método na unidade. Visando maximizar a extração das substâncias de interesse e minimizar a hidrólise e/ou degradação térmica, foram avaliadas e otimizadas as condições críticas para o processo, tais como solventes extratores, temperaturas e técnicas de extração e de secagem, dentre outras.

O procedimento final desenvolvido para preparo do ESF controle consistiu em:

- a) coleta dos frutos de *Punica granatum* L.;
- b) limpeza com solução de hipoclorito de sódio 0,03% (v/v) por 15 minutos e lavagem exaustiva com água destilada;
- c) separação manual das cascas e fracionamento em pequenos pedaços;
- d) secagem das cascas em estufa a 35 °C;
- e) pulverização em miniprocessador HC3IT;
- f) adição de 500 mL da mistura de álcool etílico absoluto 99,56% grau ACS:água ultrapura (90:10, v/v) sobre 50 g do pó das cascas em um béquer de 1 L tampado e envolto com papel alumínio;
- g) agitação em agitador KS 260 Control a 200 rpm por 48 h a temperatura ambiente (25 ± 3 °C);
- h) repouso até decantação completa;

- i) coleta e filtração do sobrenadante sob vácuo em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm;
- j) repetição do processo de extração por mais duas vezes com o resíduo da etapa anterior, totalizando três ciclos;
- k) reunião dos extratos e concentração em concentrador de amostras TecVap TE-0194 sob jato de ar comprimido até resíduo viscoso (aproximadamente 19 mL);
- l) fracionamento dos extratos em frascos de vidro para liofilização com rolha de borracha (3 mL por frasco), congelamento em nitrogênio líquido e liofilização em liofilizador K105 por 48 h.

3.2.3 Determinação da umidade dos ESFs pelo método volumétrico

A determinação da umidade nos ESFs foi realizada pelo método volumétrico com titulação direta da amostra, utilizando reagente de Karl Fisher comercial e titulador automático 785 DMP Titrino da Metrohm.

Foi realizada a padronização da solução de Karl Fischer imediatamente antes do uso, mantendo-o sempre protegido da luz. Para tal, inicialmente, após colocar metanol anidro no recipiente de titulação em quantidade suficiente para cobrir os eletrodos, foi realizada a adição automática do reagente de Karl Fischer até que o ponto final fosse atingido (determinação potenciométrica). Essa etapa foi realizada com a finalidade exclusiva de eliminar toda a umidade que pudesse estar presente no recipiente, de forma que o volume gasto não foi considerado nos cálculos. Na sequência, 5 gotas de água (20 a 35 mg) foram dispensadas no recipiente, utilizando uma seringa de 1 mL. A massa exata de água dispensada foi determinada pela diferença entre a massa da seringa antes e após dispensação. Foi realizada a titulação até o ponto de equivalência em triplicata e calculado o título do reagente, em mg de água/mL de reagente.

Para a determinação de água nas amostras, foi realizada a mesma etapa de titulação do metanol anidro (35 a 40 mL) para eliminar toda a umidade que pudesse estar presente no recipiente. Na sequência, foram adicionados, rapidamente, ao recipiente de titulação quantidade exatamente pesada da amostra (100 a 110 mg) e realizada a

titulação sob agitação magnética, determinando-se o ponto final potenciométricamente. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de água da amostra, foi calculado conforme a Equação 1.

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{v \times T}{m} \times 100 \quad (1)$$

v = volume de reagente consumido em mL.

T = título do reagente.

m = massa da amostra em mg.

II.3.2.4 Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs por CLAE-UV

Para determinação dos teores dos marcadores ativos ácido elágico e punicalagina nos ESFs comerciais, utilizando a CLAE-UV, foi necessário desenvolver e validar um método analítico capaz de fornecer resultados precisos e exatos.

II.3.2.4.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV

O desenvolvimento do método analítico utilizado nesse estudo consistiu na determinação dos parâmetros cromatográficos, de detecção e de preparo de amostra, para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs. O preparo de amostra consistiu basicamente na escolha de um solvente ou mistura de solventes compatível com o sistema de análise e que fosse capaz de solubilizar as amostras.

Visando obter resultados representativos e conclusivos, durante o desenvolvimento do método, todos os testes foram realizados com soluções dos padrões de ácido elágico, punicalagina, uracila e mistura 1:1 (p/p) das soluções de ácido elágico e punicalagina. Nas condições mais promissoras, foi utilizada também a solução do ESF controle (19), como padrão de comparação, para avaliar se, na presença da matriz, os mesmos resultados eram obtidos. Inicialmente, as bases utilizadas para obtenção do método adequado à análise proposta foram os dados obtidos da literatura consultada sobre métodos já desenvolvidos (item II.2.1) e sobre as características físico-químicas dos marcadores ativos. A partir dos resultados obtidos com condições

semelhantes às relatadas, foram feitos ajustes ou modificações completas até obtenção de um método analítico que atendesse ao objetivo proposto. As condições e parâmetros do método analítico desenvolvido estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros e condições do método analítico desenvolvido.

Parâmetro	Condições otimizadas
Equipamento	Sistema cromatográfico Surveyor Plus™ Thermo Scientific com detector PDA Plus
Volume de injeção	5 µL
Fase móvel	Água:metanol (55:45,v/v) pH 3,50 ajustado com ácido fórmico
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax® Eclipse Plus C18 (100 mm × 4,6 mm, 5 µm)
Temperatura da coluna	35 ± 1 °C
Temperatura do amostrador automático	5 ± 2 °C
Comprimento de onda para quantificação	375 nm
Comprimento de onda para confirmação da identidade	Varredura de 200 a 380 nm
Tempo de corrida	6,55 minutos
Tempo de retenção do AE	4,45 minutos
Tempo de retenção da PN	0,95 minutos

AE: ácido elágico. PN: punicalagina.

Após definição dos parâmetros cromatográficos, a viabilidade e a sensibilidade do método analítico foram testadas nas faixas de concentração necessárias para quantificação de ácido elágico e punicalagina nos diferentes ESFs. A escolha da faixa de trabalho foi feita com base nas recomendações da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017 e da Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014, todas da ANVISA.

As faixas de trabalho para ácido elágico e punicalagina foram estabelecidas considerando: (1) as possíveis amplitudes de variação dos teores dos marcadores ativos nos ESFs comerciais; (2) o objetivo proposto para o estudo (verificação da variação na concentração de ácido elágico e punicalagina nos extratos); (3) e os resultados obtidos com a estimativa das concentrações desses marcadores nos extratos. Como trata-se de extratos vegetais, em que a matriz é composta por vários componentes e que essas substâncias tem concentrações variáveis, a definição da concentração de trabalho foi realizada com base na concentração da solução de trabalho dos ESFs (50 µg/mL – 100%) e não dos marcadores ativos analisados nesse

estudo. Desse modo, as faixas de trabalho definidas durante o desenvolvimento foram 3% a 120% (1,5 a 60,0 µg/mL) da concentração de trabalho dos ESFs (50 µg/mL) para ácido elágico e 3% a 30% (1,5 a 15,0 µg/mL) da concentração de trabalho dos ESFs (50 µg/mL) para punicalagina.

||.3.2.4.2 Validação do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV

O método analítico desenvolvido para quantificação de ácido elágico e punicalagina em ESFs comerciais foi validado tendo como base as recomendações da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017 da ANVISA, por ser a norma vigente no Brasil para validação de métodos analíticos. Além disso, foram consideradas algumas orientações da Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014 e da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, ambas da ANVISA, por serem específicas e particulares para validação de métodos analíticos e bioanalíticos empregados na análise quantitativa de fitoterápicos. Também foram utilizadas orientações do Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) – Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*, 1996. Todos os cálculos foram feitos com auxílio dos *softwares* ChromQuest™ e Microsoft Excel 2010.

Durante a validação, foram realizados ensaios para determinação da linearidade da faixa de trabalho e da seletividade, precisão, exatidão, efeito matriz, robustez, LIQ e LID do método desenvolvido. Todas as soluções dos padrões de ácido elágico e punicalagina e dos ESFs foram preparadas no dia de cada teste.

||.3.2.4.2.1 Seletividade

A capacidade do método de medir exatamente o ácido elágico e a punicalagina na presença de outras substâncias possivelmente presentes na matriz (ESF) foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos para soluções padrão recém preparadas de ácido elágico e punicalagina com:

- a) soluções de ESFs representando diferentes faixas de teor de ácido elágico (40% e 15%, p/p) e do ESF controle (19);
- b) soluções dos padrões de ácido elágico e punicalagina e do ESF controle (19) submetidas a degradação neutra, ácida, básica, por oxidação e por calor;
- c) soluções de algumas substâncias possivelmente presentes como constituintes dos ESFs: ácido gálico, catequina, ácido ascórbico e ácido tânico (FOLMER *et al.*, 2014; JURENKA, 2008; MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; RAHIMI; ARASTOO; OSTAD, 2012; SREEKUMAR *et al.*, 2014);
- d) soluções dos excipientes geralmente utilizados na produção de ESFs: amido e maltodextrina.

Todas as soluções foram preparadas a 200,0 µg/mL, usando metanol como diluente. Para degradação, a 2,25 mL das soluções de ácido elágico e punicalagina e do ESF controle foi adicionado 0,25 mL de: (1) água ultrapura; (2) ácido clorídrico 1 mol/L; (3) hidróxido de sódio 1 mol/L; e (4) peróxido de hidrogênio 29%, p/p. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 24 h, sendo analisadas em cinco tempos específicos: 0, 3, 5, 7 e 24 h. Após a última coleta, os tubos foram transferidos para banho maria a 50 ± 1 °C e mantidas por 24 h nessa condição. O tempo total do estudo de degradação foi de 48 h e simultaneamente foram analisadas amostras branco, contendo apenas metanol (2,25 mL) e agentes degradantes (0,25 mL).

Após a análise cromatográfica das soluções teste e referência, foi realizada a comparação dos cromatogramas obtidos no comprimento de onda selecionado para a quantificação, das áreas sob os picos nos tempos de retenção do ácido elágico e da punicalagina, das purezas desses picos e dos espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm.

II.3.2.4.2.2 Linearidade da faixa de trabalho

A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada por meio de uma curva de calibração com cinco níveis de concentração para ácido elágico (1,5; 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 µg/mL equivalentes a 3, 30, 60, 90, 120%) e para punicalagina (1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 µg/mL equivalentes a 3, 5, 10, 20, 30%). Para construção da curva foram preparadas três

soluções estoque isoladamente para ácido elágico e punicalagina, sendo realizadas diluições adequadas para atingir as concentrações da faixa de trabalho. As concentrações das soluções estoque, de cada nível da curva de calibração e das amostras de ESFs utilizados para a precisão e na análise dos teores, bem como a proposta de diluição estão descritas na **Tabela 4**. Todas as soluções estoque e demais diluições foram preparadas em metanol, por ser o mesmo solvente orgânico da fase móvel e por promover a diluição completa dos analitos. Todas as soluções foram mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos antes de aferir o volume nos balões volumétricos e foram filtradas em filtros para seringa de celulose regenerada e reforçada com tamanho de poro de 0,45 μm antes da injeção no sistema CLAE-UV.

As equações que representam a relação entre as respostas do instrumento e as concentrações conhecidas dos analitos, foram elaboradas priorizando o modelo matemático mais simples possível. As faixas de trabalho propostas foram consideradas aprovadas na linearidade após análise estatística a um nível de significância de 5% de acordo com procedimento proposto por Souza e Junqueira (2005).

Tabela 4 – Proposta de diluição das soluções estoque e teste de ácido elágico e punicalagina e de ESFs utilizadas na validação e aplicação do método bioanalítico.

Soluções estoque							
Amostra	Massa Pesada (mg)	Fator massa ¹	Fator pureza ²	Concentração (µg/mL)	Volume total (mL)		
AE	1,00	1,0000	0,979	195,8	5,0		
PN	1,00	1,0000	0,963	192,6	5,0		
ESFs	2,00	-	-	200,0	10,0		
Soluções teste							
Ponto	AE			PN			TOTAL
	%	Conc. da Solução (µg/mL)	Volume de solução estoque (µL)	%	Conc. da Solução (µg/mL)	Volume de solução estoque (µL)	Volume total (mL)
P01	3	1,5	7,7	3	1,50	7,8	10,0
P02	30	15,0	76,6	5	2,50	13,0	10,0
P03	60	30,0	153,2	10	5,00	26,0	10,0
P04	90	45,0	229,8	20	10,00	51,9	10,0
P05	120	60,0	306,4	30	15,00	77,9	10,0
ESFs	100	50,0	250,0	-	-	-	10,0

¹ Fator massa: Razão Massa molar - MM_{AE}/MM_{AE} ou MM_{PN}/MM_{PN} .

² Fator pureza: Razão $Massa_{AE}/1$ unidade de massa do padrão ou Razão $Massa_{PN}/1$ unidade de massa do padrão.

AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

Inicialmente foi realizada a identificação dos valores dispersos (*outliers*) por meio do teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, utilizando como critério de aceitação a exclusão de, no máximo, 22% dos dados originais da curva de calibração (3 pontos), sendo mantida pelo menos uma replicada para um determinado nível de concentração. Em seguida foram realizados testes para verificar se os dados de regressão linear atendem às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) (regressão linear simples), verificando se os resíduos da regressão seguem a distribuição normal (teste de *Ryan-Joiner*), possuem variância constante por toda a faixa de trabalho, ou seja, são homoscedásticos (teste de *Levene* modificado por *Brown e Forsythe*) e são independentes (teste de *Durbin-Watson*). Por fim, por meio da ANOVA, foi feita a avaliação se a regressão é significativa e se o desvio da linearidade não é significativo, para verificação da adequação dos dados ao modelo linear.

De modo complementar, atendendo às recomendações da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017 da ANVISA, foi realizada a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito e da dispersão dos resíduos, além da avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), de modo que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990.

II.3.2.4.2.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação de duas curvas de calibração estabelecidas da mesma forma que na linearidade, com os mesmos níveis de concentração e o mesmo número de repetições. A primeira curva foi composta de soluções padrão contendo ácido elágico e punicalagina e a segunda foi construída com a adição de quantidades conhecidas de ácido elágico e punicalagina ao ESF 11 a 50% da concentração de trabalho. Após correção das respostas obtidas para as amostras a 50% da concentração de trabalho contendo ácido elágico e punicalagina (Equação 2) e confirmação da linearidade das duas curvas, foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor) para avaliar a homocedasticidade dos resíduos. Em seguida, foi utilizado o teste t de Student para comparar as inclinações e os interceptos das curvas (significância estatística estabelecida a 5%). As inclinações e os interceptos das duas curvas foram considerados equivalentes para valores de $t_{calculado}$ inferiores ao $t_{crítico}$ ($t_{calculado} < t_{crítico}$), indicando que os efeitos de matriz translacional e rotacional não foram significativos.

$$Resposta\ corrigida = Resposta_{Amostra\ com\ AE\ e\ PN} - Resposta_{Amostra\ a\ 50\%} \quad (2)$$

Resposta_{Amostra com AE e PN}: Resposta obtida para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho em que foram adicionados ácido elágico e punicalagina em diferentes concentrações.

Resposta_{Amostra a 50%}: Resposta obtida para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho.

II.3.2.4.2.4 Limites de quantificação e de detecção

Os limites inferiores foram determinados por meio das Equações 3 e 4 e da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável capaz de fornecer relação entre o sinal dos analitos e o ruído da linha

de base no cromatograma (razão sinal-ruído) de, no mínimo, 10:1 para o LIQ e, 3:1 para o LID.

$$LIQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (3)$$

$$LID = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (4)$$

II.3.2.4.2.5 Precisão

A avaliação da precisão do método foi feita por meio da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada por meio de 6 replicatas a 100% da concentração do teste (concentração de trabalho dos ESFs – 50 µg/mL), utilizando soluções individualmente pesadas e preparadas em um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Cada solução foi analisada em triplicata. A precisão intermediária foi realizada com soluções preparadas do mesmo modo, mas em dias distintos e por analistas diferentes.

Considerando a ampla variabilidade entre os ESFs comerciais (matriz do estudo), sendo que em alguns poderia ser encontrado alto teor de um marcador e ausência de outro, optou-se por realizar o ensaio de precisão com três ESFs comerciais (2, 11 e 14) e com o ESF controle (19). Cada extrato era representativo de uma faixa de concentração de ácido elágico ou de taninos totais declaradas nos laudos. Seguindo esse procedimento, não haveria o risco de conseguir resultados de precisão apenas para um dos analitos, devido a ausência de um deles, pois mesmo que em um ESFs esse analito estivesse ausente, provavelmente em outro, estaria em concentração dentro da faixa de trabalho. As soluções dos ESFs foram preparadas conforme descrito na **Tabela 4**. O DPR ou CV%, foi utilizado para expressar a precisão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a Equação 5.

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (5)$$

II.3.2.4.2.6 Exatidão

Na inexistência de placebo (extrato sem os marcadores), já que a matriz é complexa e variável, a determinação da exatidão do método foi feita por meio da adição de soluções dos padrões de ácido elágico e punicalagina em diferentes concentrações a uma amostra da matriz a 50%. Optou-se por utilizar o ESF 11 por possuir concentrações tanto de ácido elágico, quanto de punicalagina acima do LIQ (valores estimados durante o desenvolvimento).

A recuperação de ácido elágico e punicalagina (Equação 6) adicionados a solução do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho (25 µg/mL) foi determinada nas concentrações baixa, média e alta (1,5; 30,0 e 60,0 µg/mL de ácido elágico e 1,5; 5,0 e 15,0 µg/mL de punicalagina), em triplicata. O DPR para cada concentração também foi calculado.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{Concentração}_{\text{Amostra com AE e PN}} - \text{Concentração}_{\text{Amostra a 50\%}})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (6)$$

Concentração_{Amostra com AE e PN}: Concentração de ácido elágico ou punicalagina determinada para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho em que foram adicionados ácido elágico ou punicalagina nas concentrações baixa, média e alta.

Concentração_{Amostra}: Concentração de ácido elágico ou punicalagina determinada para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho.

Concentração teórica: Concentração teórica de ácido elágico ou punicalagina nas concentrações baixa, média e alta.

De modo a complementar a exatidão foi também avaliada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente a partir da curva de calibração e a concentração teórica correspondente (Equação 7).

$$\text{Exatidão\%} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (7)$$

II.3.2.4.2.7 Robustez e adequabilidade do sistema

A robustez do método, ou seja, sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, indicando sua confiança durante o uso na rotina,

foi avaliada por meio da variação de algumas condições cromatográficas e de preparo de amostra, sendo verificada, em seguida, o impacto dessas modificações sobre os teores de ácido elágico e punicalagina na amostra. Os sete parâmetros testados foram:

- a) tipo de filtro (celulose regenerada (RC) e fluoreto de polivinilideno (PVDF));
- b) estabilidade da solução (24 h);
- c) pH da fase móvel ($\pm 0,1$);
- d) composição da fase móvel ($\pm 1\%$ de metanol);
- e) fabricantes de metanol (Sigma- Aldrich e JTBaker);
- f) temperatura da coluna (± 1 °C);
- g) fluxo ($\pm 0,1$ mL/min).

Para realização dos testes, foram utilizadas duas soluções: (1) solução padrão contendo ácido elágico e punicalagina a 100% (50 $\mu\text{g/mL}$) e 25% (12,5 $\mu\text{g/mL}$) da concentração de trabalho dos ESFs; e (2) solução amostra contendo apenas ESF 11 a 100% da concentração de trabalho (50 $\mu\text{g/mL}$). O teor de ácido elágico e punicalagina na amostra (Equação 8) foi determinado para cada condição. A adequabilidade do sistema também foi verificada para cada condição, avaliando os seguintes parâmetros para os picos dos analitos na solução padrão:

- a) fator de assimetria (A_s);
- b) resolução (R_s);
- c) fator de retenção (k);
- d) retenção relativa (r);
- e) razão sinal/ruído (S/N);
- f) número de pratos teóricos (N);
- g) DPR dos tempos de retenção, das áreas sob os picos e de cada um dos parâmetros acima listados.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Área}_{\text{Solução amostra}}}{\text{Área média}_{\text{Solução padrão}}} \times 100 \quad (8)$$

Todos os parâmetros foram comparados com os obtidos na condição validada e a influência de cada parâmetro na resposta foi analisada estatisticamente pela ANOVA, a um nível de significância de 5%.

II.3.2.4.3 Aplicação do método desenvolvido e validado na análise dos ESFs

A quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina nos ESFs foi realizada por meio do mesmo método desenvolvido e validado. A análise de todos os extratos foi feita em uma única sequência analítica e as concentrações dos analitos calculadas a partir de uma curva de calibração preparada no dia da análise, que foi aprovada conforme os critérios do item II.3.2.4.2.2. As soluções dos ESFs foram preparadas conforme descrito na **Tabela 4** e analisadas em triplicata, sendo calculado o DPR.

II.3.2.5 Determinação do teor de taninos totais nos ESFs por método espectrofotométrico miniaturizado

II.3.2.5.1 Desenvolvimento do método espectrofotométrico miniaturizado

Diversas monografias de compostos naturais publicadas em farmacopeias foram utilizadas como ponto de partida para o desenvolvimento do método miniaturizado. Embora algumas etapas do procedimento analítico tenham sido basicamente idênticas aos métodos farmacopeicos, como tempo de reação e comprimento de onda, outras condições precisaram ser ajustadas para se adequar ao objetivo desse estudo (miniaturizar o método) e às características das amostras em análise e do equipamento utilizado.

Desse modo, os principais parâmetros otimizados durante o desenvolvimento do método foram a faixa de concentração das soluções teste e os volumes de todas as soluções utilizadas (amostras e reagentes). Essas otimizações foram feitas com base na sensibilidade do método e na faixa de variação do conteúdo de taninos totais presentes nos ESFs.

||3.2.5.2 Preparo das amostras e procedimento desenvolvido

Todas as soluções teste e referência foram preparadas usando água ultrapura como solvente. Para preparo das soluções estoque, 6,0 mg de cada ESF foram solubilizados individualmente em balões volumétricos de 25 mL e cada solução filtrada em filtros de celulose regenerada de 0,45 μm . Essas soluções foram usadas para preparar: (1) solução de polifenóis totais (PT); e (2) solução de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele (PNA). O conteúdo de taninos totais foi calculado pela diferença entre os teores de PT e PNA e expresso como pirogalol, por meio da equação da curva de calibração.

Para o preparo das soluções de PT, alíquotas de 160 μL das soluções estoque, 320 μL de Folin-Ciocalteu, 560 μL de água ultrapura e 960 μL de carbonato de sódio a 29% (p/v) foram adicionadas a microtubos de 2 mL nessa ordem. Após agitação em vórtex por 30 segundos, as soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos para permitir a ocorrência da reação. Alguns minutos antes do tempo terminar, ainda ao abrigo da luz, 200 μL de cada solução foram transferidos para microplacas de 96 poços e, uma vez concluído o tempo de reação, a absorvância foi determinada a 760 nm.

O preparo das soluções de PNA incluiu uma etapa anterior de pré-tratamento, a qual consistiu na adição de 10 mL das soluções estoque a 0,10 g de pó de pele e agitação vigorosa por 60 minutos. Em seguida, cada solução foi filtrada usando filtros de celulose regenerada de 0,45 μm e 480 μL do filtrado foram misturados com 320 μL de Folin-Ciocalteu, 240 μL de água ultrapura e 960 μL de carbonato de sódio a 29% (p/v), sendo obtidos os mesmos volumes finais obtidos para as soluções de PT (2 mL). O uso de uma alíquota maior das soluções de PNA em relação às de PT foi necessário devido à menor concentração de polifenóis após a adsorção, sendo realizada a correção matemática para cálculo do teor de taninos totais.

||3.2.5.3 Validação do método espectrofotométrico miniaturizado

A validação do método desenvolvido foi realizada de acordo com as recomendações das diretrizes regulatórias vigentes no Brasil para validação de métodos analíticos e bioanalíticos utilizados para análise quantitativa de fitoterápicos: Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014 e Resoluções RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 e RDC nº 166, de 24 de julho 2017, todas da ANVISA.

||3.2.5.3.1 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

A linearidade foi avaliada por meio de uma curva de calibração preparada em sete concentrações de pirogalol (0,19; 1,37; 2,55; 3,71; 5,00; 6,29 e 7,67 µg/mL), em triplicata. A solução estoque de pirogalol (240 µg/mL) foi preparada em água e 3,2; 22,8; 42,5; 61,8; 83,3; 104,8 e 127,8 µL dessa solução foram transferidos para sete microtubos de 2 mL. Em seguida, 320 µL de Folin-Ciocalteu foram adicionados a cada tubo e o volume aferido para 1040 µL por meio da adição de volumes determinados de água para cada um dos microtubos. Por fim, foram adicionados 960 µL de carbonato de sódio a 29% (p/v) e o mesmo procedimento descrito para PT foi realizado.

As equações foram obtidas por meio da elaboração de um gráfico de respostas *versus* concentrações. Os *outliers* foram identificados pelo teste de Jackknife ($\alpha = 0,05$) e, em seguida, foram utilizados testes estatísticos para verificar se os dados obtidos atendiam às premissas do método dos mínimos quadrados ordinários, conforme procedimento desenvolvido por Souza e Junqueira (2005). A normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos foram avaliadas por meio dos testes de Ryan-Joiner, Levene e Durbin-Watson, respectivamente. Em seguida, a adequação dos dados ao modelo linear foi verificada avaliando-se a significância da regressão e o desvio de linearidade por meio da aplicação da técnica de análise de variância (ANOVA). A significância estatística foi estabelecida a 5%.

Os limites inferiores de detecção (LID) e de quantificação (LIQ) foram estimados a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de

calibração (termo *DP* nas Equações 3 e 4) e da inclinação média das 3 curvas (termo *IC* nas Equações 3 e 4).

II.3.2.5.3.2 Precisão e exatidão

A avaliação da precisão do método foi feita em dois níveis. A repetibilidade (precisão intracorrída) foi determinada por meio do Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) de seis repetições a 100% da concentração de trabalho (240 µg/mL de ESF), preparadas independentemente em um curto período de tempo pelo mesmo analista (Equação 5, item II.3.2.4.2.5). O ensaio foi realizado com o ESF 11, o extrato comercial com maior integridade e concentração de taninos totais. A precisão intermediária (intercorridas) foi determinada também por meio do DPR dos resultados obtidos com seis replicatas preparadas independentemente três vezes por diferentes analistas e em dias distintos (n = 18).

A exatidão foi avaliada por meio do método de adição de padrão. A recuperação do pirogalol (Equação 9) adicionado a uma solução do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho (120 µg/mL) foi determinada nas concentrações baixa, média e alta (0,19; 3,71 e 7,67 µg/mL de pirogalol), em triplicata. O DPR para cada concentração também foi calculado.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{Concentração}_{\text{Amostra com pirogalol}} - \text{Concentração}_{\text{Amostra}})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

Concentração_{Amostra com pirogalol}: Concentração de pirogalol determinada para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho em que foi adicionado pirogalol nas concentrações baixa, média e alta.

Concentração_{Amostra}: Concentração de pirogalol determinada para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho.

Concentração teórica: Concentração teórica de pirogalol nas concentrações baixa, média e alta.

Adicionalmente, a exatidão do método espectrofotométrico miniaturizado foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes da aplicação do método tradicional farmacopeico (método validado, com exatidão estabelecida). Essa avaliação foi realizada por meio da relação entre as concentrações médias determinadas experimentalmente pelo método espectrofotométrico miniaturizado e pelo método tradicional farmacopeico.

II.3.2.5.3.3 Efeito matriz e seletividade

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação de duas curvas de calibração estabelecidas da mesma forma que na linearidade, com os mesmos níveis de concentração e o mesmo número de repetições. A primeira curva foi composta de soluções padrão contendo pirogalol e a segunda foi construída com a adição de quantidades conhecidas de pirogalol ao ESF 11 a 50% da concentração de trabalho. Após correção das respostas obtidas para as amostras contendo pirogalol (Equação 10) e confirmação da linearidade das duas curvas, foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor) para avaliar a homocedasticidade dos resíduos. Em seguida, foi utilizado o teste t de Student para comparar as inclinações e os interceptos das curvas (significância estatística estabelecida a 5%). As inclinações e os interceptos das duas curvas foram considerados equivalentes para valores de $t_{calculado}$ inferiores ao $t_{crítico}$ ($t_{calculado} < t_{crítico}$), indicando a ausência de efeito de matriz significativo.

$$Resposta\ corrigida = Resposta_{Amostra\ com\ pirogalol} - Resposta_{Amostra} \quad (10)$$

Resposta_{Amostra com pirogalol}: Resposta obtida para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho que foi adicionado pirogalol em diferentes concentrações.

Resposta_{Amostra}: Resposta obtida para amostras do ESF 11 a 50% da concentração de trabalho.

II.3.2.5.3.4 Robustez

A robustez foi avaliada por meio da ANOVA e do Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett, considerando variações no tempo de reação e no tipo de água. Duas amostras, uma com água ultrapura e outra com água destilada, foram preparadas em triplicata e a absorvância foi determinada após 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120, 180, 300 e 420 minutos.

II.3.2.5.4 Aplicação do método espectrofotométrico miniaturizado desenvolvido e validado na análise dos ESFs

Uma vez validado, o método foi considerado adequado para aplicação na quantificação de taninos totais nos 18 ESFs comerciais e no ESF controle (19). Foi realizado exatamente o mesmo procedimento descrito no item II.3.2.5.2 e as amostras

foram analisadas em triplicata. O conteúdo de taninos totais foi calculado para cada amostra e expresso como pirogalol.

II.3.2.6 Identificação dos ESFs por CCD

A identidade de todos os ESFs comerciais foi confirmada por CCD, comparando com os padrões de ácido elágico e punicalagina e com o ESF controle, para obtenção de informações a respeito da constituição fitoquímica e da integridade dos extratos. O desenvolvimento do método consistiu, principalmente, na otimização do tipo de fase estacionária, composição da fase móvel, comprimento da placa, tipo de revelador, volume de aplicação e concentrações das soluções aplicadas, visando a obtenção de boa resolução entre as manchas.

Todos os testes de desenvolvimento foram realizados com soluções em metanol de ácido elágico, punicalagina, mistura 1:1 (p/p) de ácido elágico e punicalagina, ESF controle (19), ESFs comerciais representando cada faixa de teor de ácido elágico (90%, 40% e 15%, p/p) declarada no laudo (ESFs 1, 2 e 11, respectivamente). As soluções foram aplicadas, com auxílio de um capilar de vidro de 10 µL, em placas cromatográficas de alumínio revestidas com Sílica Gel 60 F₂₅₄ ou Sílica Gel 60 RP18 F₂₅₄ a uma altura de 1 cm do início da placa (10 ou 15 cm de comprimento). As fases móveis testadas foram vertidas em cuba contendo folha de papel de filtro na vertical em toda a extensão de uma das paredes, para permitir a saturação do ambiente interno. Após saturação completa, as placas cromatográficas foram introduzidas na cuba e mantidas para eluição até aproximadamente 1,5 cm do término da placa. Após secagem do solvente, as placas foram analisadas visualmente, sob luz UV a um comprimento de onda de 254 nm e posteriormente nebulizadas com um revelador.

A melhor condição obtida, que permitiu diferenciar as manchas de ácido elágico e punicalagina e que foi utilizada para análise dos 18 ESFs, sendo feita a comparação com os padrões de ácido elágico e punicalagina, consistiu no uso de:

- a) soluções dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina a 2 mg/mL (aplicação de 10 µL);
- b) água pH 2,00 ajustado com ácido acético como fase móvel;

CAPÍTULO II

- c) solução de NaNO_2 1% (p/v) em metanol como revelador;
- d) placas cromatográficas de alumínio revestidas com Sílica Gel 60 F₂₅₄ (2,5 x 15 cm).

As análises foram feitas em duplicata e a posição de cada mancha designada pelo fator de retenção (R_f), calculado conforme a Equação 11.

$$R_f = \frac{\text{Distância atingida pela mancha a partir da origem}}{\text{Distância percorrida pelo solvente desde a origem}} \quad (11)$$

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 Seleção e aquisição dos ESFs comerciais

Como resultado do levantamento de indústrias e distribuidoras foram contatadas 76, no total, sendo que 60 não produziam ou distribuíaam o ESF, 13 produziam ou distribuíaam, mas não doaram por impossibilidade de fracionamento e 3 doaram (extratos 1, 11 e 17/18). Já em relação às farmácias de manipulação, foram contatadas 58, no total, sendo que 36 não possuíam ESF, 8 manipulavam, mas não puderam doar e 14 doaram.

Apenas uma indústria não forneceu o laudo de análises (extratos 17/18). Para os demais extratos, uma cópia do laudo disponibilizado pelo fabricante e/ou distribuidor foi enviada junto com a amostra. A classificação dos ESFs de acordo com o teor de ácido elágico ou de taninos totais declarado nos laudos, bem como um resumo das principais informações contidas nos mesmos estão descritas na **Tabela 5**. Além disso, a cor e o aspecto macroscópico dos ESFs comerciais, do ESF controle (19) e dos padrões de ácido elágico e punicalagina podem ser observados na **Figura 3**.

CAPÍTULO II

Tabela 5 – Classificação dos ESFs de acordo com o teor de ácido elágico ou de taninos totais declarado e resumo das principais informações contidas nos laudos fornecidos pelos fabricantes/distribuidores.

ESFs	Teor de Taninos Totais (% p/p)	Teor de AE (% p/p)	Solvente Utilizado	Método de Secagem	Relação Droga Vegetal/Derivado Vegetal (p/p)	Excipiente	Perda por Dessecação (% p/p) ⁷
1	-	90,77	Metanol	-	30:1 - 40:1	-	5,89
2 ¹	-	44,91	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	3,45
3 ¹	-	44,91	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	2,93
4	-	44,06	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	4,41
5	-	40,86	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	3,26
6 ²	-	40,84	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	1,88
7 ²	-	40,84	Água e Etanol	-	-	≤ 5% (p/p) de Maltodextrina	1,88
8 ³	-	40,80	-	-	-	-	5,55
9 ³	-	40,80	-	-	-	-	5,55
10	-	40,70	Água e Álcool	-	-	-	2,90
11	-	15,50	Etanol (90-100%) e água (0-10%)	-	4-7:1 (Cascas secas: extrato seco)	Maltodextrina Dióxido de silício Antiaglutinante	0,70
12	9,37	-	-	Spray-dryer	-	Maltodextrina	2,94 ⁸
13	9,37	-	-	-	-	-	2,94 ⁸
14 ⁴	7,04	-	Água e Etanol	Spray-dryer	1:1	Maltodextrina	5,89 ⁸
15 ⁴	7,04	-	-	-	-	-	5,89 ⁸
16	-	-	-	-	-	-	5,10
17 ⁵	-	-	-	-	-	Amido	-
18 ⁵	-	-	-	-	-	Maltodextrina	-
19 ⁶	-	-	Água e Etanol (10:90, v/v)	Liofilização	3:1 (Pó da casca: extrato liofilizado)	Nenhum	8,72 ⁹

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

⁵Extratos fabricados pela mesma indústria, mas com excipientes diferentes: extrato 17 com amido e extrato 18 com maltodextrina. O laudo não foi disponibilizado.

⁶Extrato controle.

⁷A especificação da porcentagem de perda máxima dos laudos é variável (8,0% a 5,0%, p/p) para 1 a 2 g de extrato em estufa a 105 °C até peso constante.

⁸O nome do teste no laudo é apenas "umidade", não especificando o método.

⁹Determinado pelo método volumétrico.

AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

Figura 3 – Cor e aspecto macroscópico dos ESFs comerciais (1 a 18), do ESF controle (19) e dos padrões de ácido elágico e punicalagina.



AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

Além das informações apresentadas na **Tabela 5**, diversos dados de identificação e de caracterização botânica, físico-química e microbiológica estão descritos (especificação e valores obtidos). São eles: distribuidora, lote da distribuidora, fornecedor, lote do fornecedor, origem, data de fabricação, data de validade, parte utilizada, informações botânicas, *CAS number* (*Chemical Abstracts Service*) do ácido elágico, DCB (Denominação Comum Brasileira) do ácido elágico, método de descontaminação, advertências, armazenamento, aspecto macroscópico, cor, sabor, odor, identificação, elementos estranhos, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, cinzas sulfatadas, densidade aparente, fluidez volumétrica, pH, solubilidade, metais pesados, metais pesados (AAS), chumbo (Pb), arsênio (As), cádmio (Cd), cloreto (Cl), mercúrio (Hg), resíduo de pesticidas, sulfato, fosfato orgânico, solvente residual, fungos e leveduras totais, bactérias totais aeróbias, contagem total de bactérias, *Escherichia coli* (coliformes), *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *P. aeruginosa*, coliformes a 45 °C, aflatoxinas, outras enterobactérias e bactérias Gram-negativas bile tolerantes.

Entretanto, é importante destacar que tanto o tipo e o número de informações presentes nos laudos, quanto os limites das especificações dos ensaios são bastante variáveis, o que destaca a falta de padronização para exigências regulatórias em relação a esses produtos. Isso leva a disponibilização no mercado de produtos que passaram por níveis de controle de qualidade distintos, implicando em uma maior variabilidade das características dos produtos, como concentração dos marcadores ativos, solubilidade, teor de água, dentre outros, que podem impactar diretamente na intensidade dos efeitos terapêuticos e na toxicidade do produto.

Como pode ser observado na **Tabela 5**, os extratos possuem características, modos de produção e composição em termos de teores de ácido elágico ou de taninos totais diferentes. Outra observação interessante é a correlação existente entre as cores dos extratos e dos padrões de ácido elágico e punicalagina e os teores declarados. Os extratos de 1 a 10 possuem elevado teor de ácido elágico ($\geq 40\%$, p/p) e cor igual ou muito semelhante à cor do padrão de ácido elágico. Já os extratos de 11 a 18, com baixos teores de ácido elágico, ou teores de taninos totais, possuem cor marrom ou amarela, aproximando-se mais da cor do padrão de punicalagina, do ESF controle (19) e da cor do pericarpo do fruto de *Punica granatum* L. (amarelo quando *in natura* e marrom quando seco) (WHO, 2009). Essa análise da cor é uma evidência da integridade do extrato, de modo que o tom acinzentado pode ser um indício de adulteração com adição de altas quantidades de ácido elágico ao extrato e/ou hidrólise excessiva durante a produção. Entretanto, tal confirmação só é possível com a determinação dos teores e do perfil cromatográfico dos extratos (itens II.4.4, II.4.5 e II.4.6). Essas diferenças podem refletir nas atividades biológicas e na toxicidade dos ESFs, sendo necessária a padronização da composição química dos mesmos (MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013).

Diferenças entre produtores, locais e condições de plantio e climáticas têm um impacto sobre a composição química das plantas (MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013), mas é difícil que haja uma variação tão expressiva na concentração de um componente, como ocorre com o ácido elágico nesses extratos.

Lansky (2006) verificou que, em relação à atividade antitumoral *in vitro* para células de câncer de próstata, o sinergismo entre os vários componentes da *Punica granatum* L. é um fator determinante para a atividade, e que excesso de ácido elágico adicionado reduz a atividade. Isso evidencia o fato de que aumentar a concentração de um marcador ativo em um extrato indiscriminadamente nem sempre resulta em um aumento da atividade e pode até levar a um aumento da toxicidade, como foi bem destacado, também por Lansky (2006), já que o ácido elágico em concentrações elevadas pode levar a uma alteração da hemostasia, exacerbando a coagulação sanguínea.

Madrigal-Carballo *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2009) também verificaram essa variação na composição química de produtos contendo extratos de *Punica granatum* L. que foram adquiridos no comércio local. A maior parte dos produtos continha quantidades elevadas de ácido elágico e pouco ou nenhum indício de taninos característicos da *Punica granatum* L., como a punicalagina e a punicalina. Outra situação observada pelos autores foi a ausência de quaisquer taninos, ou mesmo de ácido elágico, fato que também é um problema, pois a ausência de substâncias relacionadas às atividades biológicas atribuídas ao extrato leva a ausência do efeito terapêutico esperado.

II.4.2 Preparo do ESF controle

Para o desenvolvimento do método de preparo do ESF controle, foram tomadas algumas medidas para maximizar a extração das substâncias de interesse, como:

- a) escolha do solvente extrator: visando favorecer a solubilização das substâncias de interesse e a comparação com os extratos comerciais (solvente semelhante), além de ter, preferencialmente, baixa toxicidade;
- b) controle da temperatura do processo e da quantidade de água na solução extratora: visando minimizar a hidrólise e/ou degradação térmica dos taninos hidrolisáveis (punicalina, punicalagina) e demais substâncias termosensíveis presentes no pericarpo do fruto.

Na literatura, há relato do uso de diversos solventes e misturas em diferentes proporções para a produção de extratos de *Punica granatum* L., tais como, etanol, metanol, acetona e éter puros ou em soluções com diferentes proporções, mas sempre com maior porcentagem de solvente orgânico em relação ao aquoso (água pura ou acidificada). Entretanto, a prevalência é do uso de etanol como solvente principal (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; AL-ZORECK, 2009; JAYAKUMAR; KANTHIMATHI, 2011; MORZELLE, 2012).

Considerando essa prevalência, tanto na literatura, quanto nos laudos dos extratos comerciais (**Tabela 5**), optou-se por utilizar a mistura de etanol 99,56% e água (90:10, v/v) como solução extratora (PANICHAYUPAKARANANT; TEWTRAKUL; YUENYONGSAWAD, 2010). A baixa porcentagem de água, a proteção da luz e o uso de baixas temperaturas durante todo o processo, foram preconizados para minimizar a ocorrência de hidrólise e de degradação térmica (BARROS, 2011; MANSOUR *et al.*, 2013; MARCHI *et al.*, 2015; PAUL; GHOSH, 2012).

Os desafios para obtenção de condições de preparo ideais e simultaneamente próximas aos métodos de preparo dos extratos comerciais, não se restringiram à escolha do melhor solvente extrator e da temperatura ideal. O processo final de secagem do extrato também foi um ponto importante para que fosse retirado todo o solvente do extrato.

As técnicas de secagem mais utilizadas para preparo de extratos secos são a evaporação rotativa, o leito de jorro, a liofilização e a nebulização ou *spray-dryer*. Essa última foi utilizada na produção de alguns extratos comerciais (**Tabela 5**) e é muito eficiente para a produção de pó seco a partir de líquidos, mantendo as características originais do produto, devido à temperatura relativamente baixa e ao curto período de tempo necessários para a secagem. Os extratos secos produzidos por *spray-dryer*, geralmente são finos, fluidos, homogêneos e com baixa umidade final (SILVA *et al.*, 2012). Devido à indisponibilidade desse equipamento, foi necessário buscar outras formas de secar o extrato final. As tentativas de evaporação a temperatura ambiente em capela de exaustão, sob jato de ar comprimido, sob vácuo ou evaporação rotativa, não foram eficazes, pois em todas elas ocorria a formação de uma camada de alta

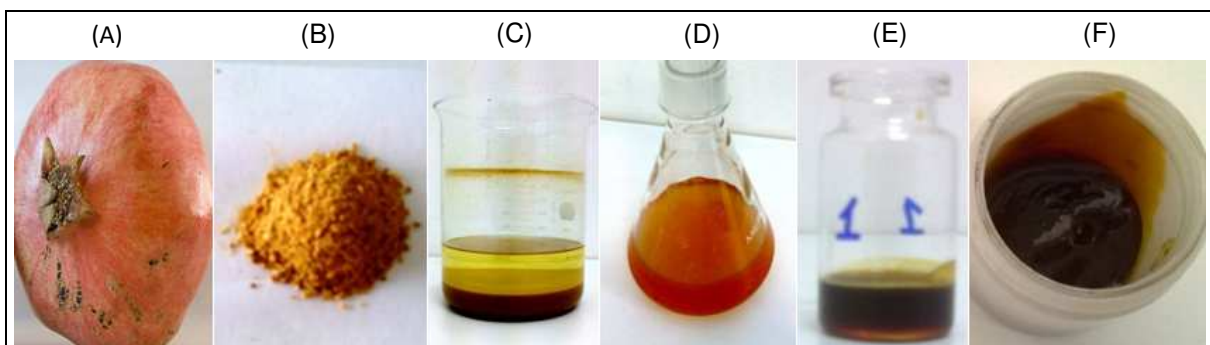
viscosidade na superfície que impedia a evaporação do solvente residual. A adição de excipientes utilizados pelas indústrias, como amido e maltodextrina, também não permitiu a obtenção de um resíduo seco (SILVA *et al.*, 2012).

Desse modo, a alternativa para remoção total do solvente extrator foi à liofilização. Essa técnica, embora cara, é muito vantajosa para a secagem de extratos concentrados, pois devido às condições do processo, como baixas temperatura e pressão necessárias à sublimação, as propriedades nutricionais e bioquímicas do produto são mantidas (BARROS, 2011; SANTOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Essa técnica foi utilizada por diversos outros autores para a produção de ESFs, tais como Barros (2011), Fischer; Carle e Kammerer (2011), Foss *et al.* (2014), Holetz *et al.* (2002), Marchi *et al.* (2015) e Martin *et al.* (2009).

A liofilização por 48 horas permitiu a secagem completa do extrato. Entretanto, o pó obtido foi extremamente higroscópico, sendo necessária a vedação rápida e completa dos frascos. Ainda assim, a absorção de água foi inevitável, já que a higroscopicidade é uma característica marcante de produtos liofilizados, como destacado pela etimologia da palavra (do Grego *Lyen*: dissolver e *Philos*: afinidade) (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998; SILVA *et al.*, 2012).

Para assegurar que as quantidades de ESF controle utilizadas nos demais ensaios fossem proporcionais às quantidades pesadas dos ESFs comerciais, foi realizada a determinação da umidade do extrato controle liofilizado em diferentes tempos do desenvolvimento do projeto, para assegurar que não ocorreram variações no conteúdo de água do extrato liofilizado (FARMACOPEIA, 2010). Essas variações não foram observadas, sendo o teor de umidade mantido constante ao longo período do estudo. As etapas do processo de produção do ESF controle podem ser observadas na **Figura 4**.

Figura 4 – Etapas do processo de produção do ESF controle: (A) fruto de *Punica granatum* L., (B) pó da casca do fruto seca, (C) extrato e resíduo no terceiro ciclo de extração, (D) extrato total obtido após os três ciclos, (E) extrato concentrado, (F) ESF controle final.



ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

||.4.3 Determinação da umidade dos ESFs pelo método volumétrico

Na determinação da umidade dos ESFs, foram obtidos valores de teor de água percentual inferiores a 10,00% (p/p) e variando entre 4,32% (p/p) e 9,68% (p/p) (**Tabela 6**). Todos os valores de DPR obtidos foram inferiores a 2,0% (GREEN, 1996). O método volumétrico foi escolhido, mesmo sendo mais complexo e mais caro do que o método gravimétrico (perda por dessecação) pois, com esse último, caso houvessem substâncias voláteis nos ESFs, o teor de água obtido seria superestimado.

Ao comparar os valores determinados com os valores descritos nos laudos dos fornecedores/produtores, os quais variam entre 0,70% (p/p) e 5,89% (p/p) é possível perceber que há uma diferença significativa em todos os ESFs comerciais, de modo que os valores determinados foram sempre superiores aos declarados. Essa diferença pode ser devido ao uso de métodos diferentes, que podem possuir sensibilidades distintas, mas também pode estar relacionada ao armazenamento e manuseio nos fornecedores. A manipulação constante do lote de um determinado ESF em uma farmácia de manipulação, por exemplo, pode levar ao aumento do teor de água no ESF, justificando a obtenção de valores superiores aos valores declarados nos laudos.

Tabela 6 – Resultados obtidos na determinação da umidade nos ESFs pelo método volumétrico.

ESFs	Teor de água (% p/p)	DPR (%)	ESFs	Teor de água (% p/p)	DPR (%)
1	8,40	0,23	11	7,20	1,24
2 ¹	6,20	1,44	12	7,27	1,65
3 ¹	6,46	1,53	13	7,75	1,91
4	6,31	1,73	14 ⁴	6,76	1,86
5	6,29	0,33	15 ⁴	6,84	0,54
6 ²	9,68	1,65	16	7,08	1,49
7 ²	9,24	0,37	17 ⁵	5,48	1,37
8 ³	7,40	1,60	18 ⁵	7,87	0,37
9 ³	7,63	0,92	19 ⁶	8,72	0,49
10	4,32	1,56			

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

⁵Extratos fabricados pela mesma indústria, mas com excipientes diferentes: extrato 17 com amido e extrato 18 com maltodextrina. O laudo não foi disponibilizado.

⁶Extrato controle.

DPR: desvio padrão relativo. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

O limite máximo de umidade especificado e permitido é um ponto não muito bem estabelecido. Nos compêndios e normas nacionais vigentes há valores diferentes, de modo que não há um consenso sobre qual o limite máximo permitido. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5^a edição (2010), os extratos secos são preparações sólidas, obtidas por evaporação do solvente utilizado no preparo, que possuem, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculado como porcentagem de massa, de modo que, nesse caso, o limite máximo permitido seria de 5,0% (p/p). Entretanto, ao verificar a especificação na única monografia de extrato seco disponível na Farmacopeia Brasileira 5^a edição (2010) (Aloe extrato seco), o limite para água é de 12,0% (p/p), contradizendo a definição de extrato seco. Na Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014 essa ampla variabilidade no teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias também é citada, tendo uma amplitude de 8% a 14% (p/p).

Diante disso, pode-se concluir que todos os ESFs, com exceção do ESF 10, tem umidade acima do limite estabelecido para extratos secos (5,0%, p/p), dentro do conceito apresentado na Farmacopeia Brasileira 5^a edição (2010). Entretanto, não é possível concluir, com base nas orientações dos compêndios oficiais se os valores

obtidos são significativos, já que as especificações nas monografias são extremamente variáveis, sendo necessário realizar uma análise específica do impacto de teores de água acima de 5% (p/p) nos ESFs.

II.4.4 Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs por CLAE-UV

II.4.4.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV

O desenvolvimento do método analítico é a etapa crucial para assegurar a obtenção de bons resultados na validação e garantir a emissão de valores de teor confiáveis durante análise de amostras reais. Embora existam vários métodos para quantificação de ácido elágico ou de punicalagina na literatura, utilizando a CLAE-UV como técnica cromatográfica, a reprodução das condições descritas pelos autores não permitiu a obtenção de bons resultados em termos de separação dos analitos e, principalmente, de retenção (AMYRGIALAKI *et al.*, 2014; AQIL *et al.*, 2012; BALA *et al.*, 2006; BANERJEE *et al.*, 2012; BORGES; CROZIER, 2012; ÇAM; İÇYER, 2013; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2013; MIDDHA; USHA; PANDE, 2013; MO *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014; SEERAM *et al.*, 2005; SENTANDREU; CERDÁN-CALERO, SENDRA, 2013; ROMANI; CAMPO; PINELLI, 2012; WANG *et al.*, 2013; ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010; ZHANG *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2008). Em todos os casos pelo menos uma das substâncias, geralmente a punicalagina, era eluída no volume morto do sistema, indicando baixa interação com as fases estacionárias e/ou prevalência de afinidade pelas fases móveis.

Desse modo, o estabelecimento da técnica e dos parâmetros de detecção mais adequados ao ensaio foi realizada visando a obtenção de altas sensibilidade e seletividade para os dois analitos na quantificação simultânea, e considerando a facilidade de uso por empresas que produzem ou manipulam os ESFs. Foram realizados testes em dois cromatógrafos a líquido de alta eficiência e um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), ambos acoplados a detectores PDA, e em um sistema de CLAE-EM/EM. Para a otimização, além do ajuste de temperatura

do forno de colunas, fluxo, volume de injeção, parâmetros de detecção e concentração das amostras testadas, foram utilizadas colunas cromatográficas com diferentes fases estacionárias e diversas composições e proporções de solventes da fase móvel, para abranger diferentes mecanismos de separação, almejando alcançar bons resultados.

Assim como descrito para a CCD (item II.4.6), essa dificuldade na obtenção de bons fatores de retenção para a punicalagina pode estar relacionada à polaridade e ao tamanho molecular elevados, tornando desafiadora e dispendiosa a obtenção de uma condição que permitisse a quantificação dos analitos nos ESFs com seletividade satisfatória. Isso porque grande parte dos interferentes presentes na matriz (excipientes e demais constituintes polares dos extratos) podem ser eluídos com tempos de retenção muito baixos, interferindo na precisão, exatidão e integridade dos picos de analitos que são eluídos em tempos de retenção semelhantes. Por isso, a determinação de parâmetros de detecção e cromatográficos adequados foi a etapa limitante durante o desenvolvimento do método analítico.

Na tentativa de conseguir a retenção da punicalagina, a resolução entre os picos dos dois analitos e a separação de possíveis interferentes, assegurando a seletividade do método, foram realizados inúmeros testes, modificando diversos parâmetros que influenciam na separação cromatográfica e na detecção (**Tabela 7**). No início dos testes com cada coluna cromatográfica, foram utilizados gradientes exploratórios, com ampla variação nas proporções dos constituintes da fase móvel, servindo como ponto de partida para os demais testes e ajustes (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

Tabela 7 – Parâmetros modificados durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs.

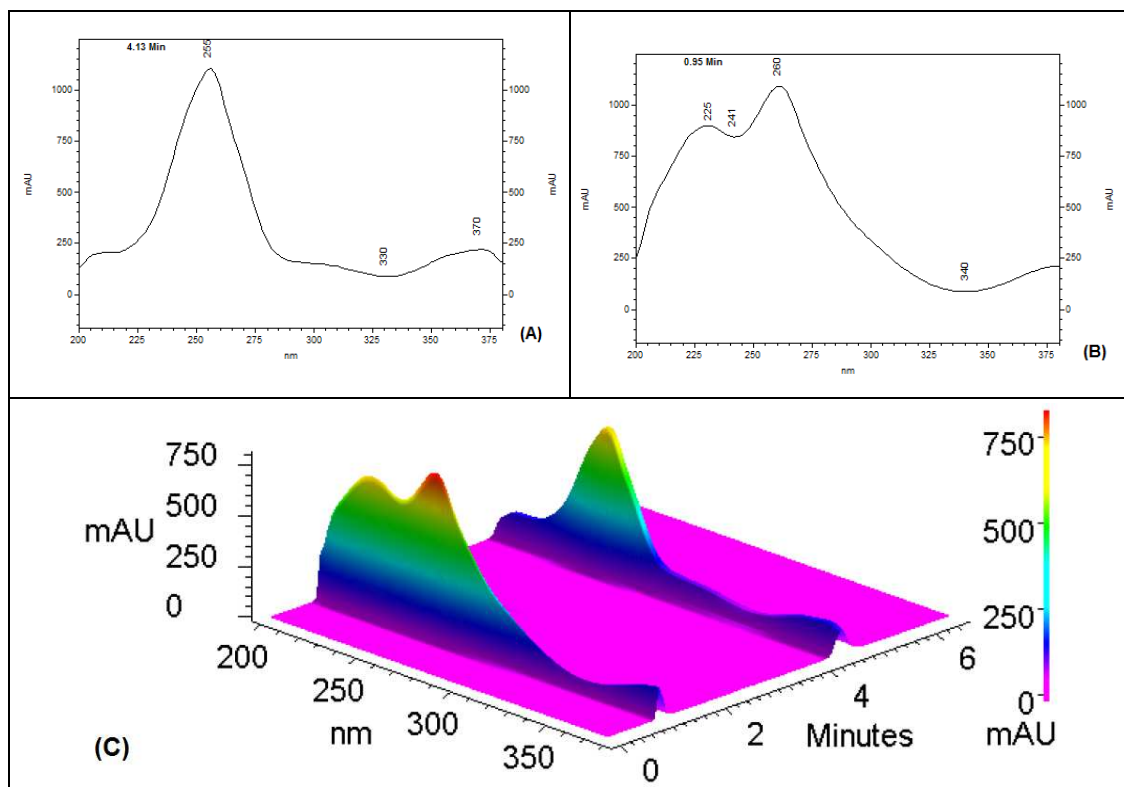
Parâmetro	Modificações feitas para aumentar a interação com a fase estacionária, sensibilidade e seletividade.
Fase móvel	Ajuste de pH para manter os analitos na forma ionizada ou não ionizada, de acordo com o teste → ácido fórmico e ácido acético. Ajuste da polaridade da fase móvel com uso de diferentes misturas de solventes e proporções → água, metanol, acetonitrila, isopropanol, hexano e tampão fosfato de sódio pH 7,41 com tetrabutilamônio de potássio 10 mM.
Colunas cromatográficas	Variação no comprimento, diâmetro interno, tipo e tamanho das partículas da fase estacionária → Phenomenex Kinetex® C18 (100 mm × 3 mm, 1,7 µm), Agilent Zorbax® Eclipse Plus C18 (100 mm × 4,6 mm, 5 µm), ACE® C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), Merck Millipore® LiChrospher® C18 (250 mm × 4 mm, 5 µm), Merck Millipore® Purospher™ STAR NH2 (250 mm × 4 mm, 5 µm), Agilent Zorbax® CN (150 × 4,6 mm, 5 µm), Merck Millipore® SeQuant® ZIC®-pHILIC (100 mm × 4,6 mm, 5 µm).
Modos de separação cromatográfica	Normal, reversa e HILIC → testadas nas diferentes colunas citadas, por meio da alteração do tipo e proporção dos solventes da fase móvel.
Temperaturas das colunas	30 °C, 35 °C, 40 °C e 50 °C.
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min, 1 mL/min e 1,5 mL/min.
Volume de injeção	5 µL, 10 µL e 20 µL.
Comprimentos de onda	254 nm, 375 nm e varredura de 200 a 380 nm.

As tentativas de otimização foram realizadas em quatro equipamentos, sendo um CLAE-EM/EM, um CLUE-UV e dois CLAE-UV. A espectrometria de massas foi avaliada, principalmente por sua elevada seletividade e sensibilidade quando comparada a sistemas de CLAE-UV (ZHOU *et al.*, 2005). Entretanto, embora a seletividade realmente tenha sido significativa e obtida sem a necessidade de muitas otimizações, a sensibilidade para a punicalagina não foi tão expressiva, quanto o esperado, visto que mesmo em condições brandas de ionização ocorria a fragmentação das moléculas de punicalagina ainda na fonte, reduzindo o sinal desse analito em sua forma íntegra (íon M-H⁺). No sistema CLUE-UV e em um dos sistemas CLAE-UV utilizados nos testes, a sensibilidade também não foi tão elevada, provavelmente em consequência do desgaste das lâmpadas. Entretanto, as respostas, em termos de retenção obtidas nos três sistemas (2 CLAE-UV e CLUE-UV), foram semelhantes nas mesmas condições testadas. Desse modo, considerando a elevada sensibilidade do sistema CLAE-UV Surveyor Plus™ Thermo Scientific com detector PDA Plus, esse equipamento foi selecionado para validação do método

analítico desenvolvido. Além disso, foi priorizado o uso de um equipamento mais barato e mais simples em termos de facilidade de operação e nível de qualificação dos operadores, para que o método desenvolvido tenha maior alcance e aplicabilidade nas empresas de produção, distribuição e manipulação de fitoterápicos (CHAN; LEUNG; ZHAO, 2009).

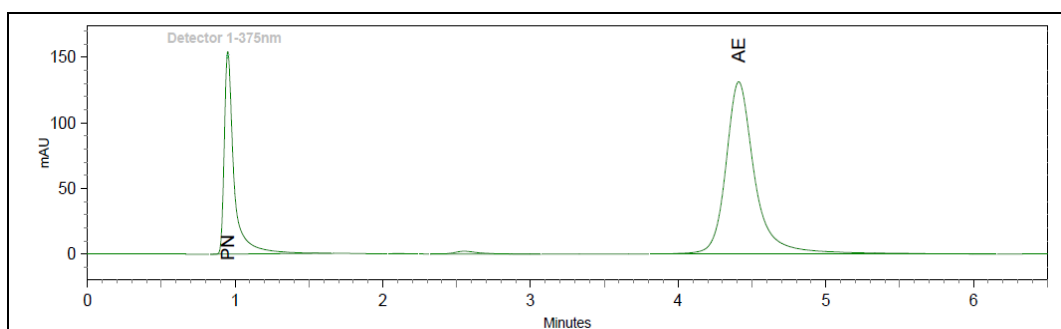
Mesmo após os inúmeros testes realizados, não foi possível promover uma retenção elevada para a punicalagina, já que mesmo com grande variação de polaridade e pH da fase móvel, e dos modos de separação cromatográfica com diferentes fases estacionárias, as modificações nos tempos de retenção foram mínimas ($\pm 0,1$ min de variação). Vora, Londhe e Pandita (2015) e Bala *et al.* (2006) também não conseguiram retenção para a punicalagina e utilizaram, com sucesso, o método desenvolvido e validado na quantificação dessa substância em soro de ratos para um estudo farmacocinético. Desse modo, a alternativa para garantir a seletividade do método foi a escolha de um comprimento de onda mais elevado para a análise, no qual outras substâncias, além do ácido elágico e da punicalagina, apresentassem mínima absorção (comprimento de onda mais seletivo). Os espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm obtidos para o ácido elágico e para a punicalagina foram semelhantes em termos de formato, máximos e mínimos de absorção, aos espectros fornecidos no laudo de análise do fabricante e obtidos por outros autores (**Figura 5**) (AMYRGIALAKI *et al.*, 2014; ROMANI; CAMPO; PINELLI, 2012). Um cromatograma obtido a 375 nm para ácido elágico e punicalagina a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ pode ser visto na **Figura 6**.

Figura 5 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos. (A) Ácido elágico a 50,0 µg/mL em metanol. (B) Punicalagina a 50,0 µg/mL em metanol. (C) Espectro de absorção 3D.



UV: ultravioleta.

Figura 6 – Cromatograma obtido por CLAE-UV a 375 nm para ácido elágico e punicalagina a 50,0 µg/mL.



CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Após definição dos parâmetros cromatográficos, foi avaliada a viabilidade e a sensibilidade do método analítico, nas faixas de concentração necessárias para quantificação de ácido elágico e punicalagina nos diferentes ESFs. Desse modo,

optou-se por avaliar a existência de linearidade em uma ampla faixa, equivalente à preconizada na Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017 da ANVISA para determinação de impurezas: “Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado”. Isso porque nos ESFs poderia haver uma variação de teor desde valores residuais até próximos de 100%. Desse modo, foi realizada, ainda no desenvolvimento uma análise preliminar para estimativa dos possíveis limites inferiores e superiores e das concentrações dos marcadores presentes nos ESFs. Para isso, foram utilizadas soluções padrão contendo ácido elágico e punicalagina com concentrações variando entre 1% e 120% e soluções de ESFs representando cada faixa de teor de ácido elágico (90%, 40% e 15%, p/p) ou de taninos totais declarados nos laudos. A partir dessas estimativas, foram definidos os níveis de concentrações de ácido elágico e punicalagina nas faixas de trabalho, priorizando o uso de intervalos proporcionalmente espaçados, para determinação da linearidade, dos limites inferiores reais, da precisão, da exatidão e do efeito matriz do método durante a validação propriamente dita.

II.4.4.2 Validação do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV

Após desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs por CLAE-UV, foi realizada a validação, de modo que os resultados obtidos, e apresentados nos itens II.4.4.2.1 a II.4.4.2.7, estão de acordo com as recomendações da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017, da Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014 e da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, todas da ANVISA, e do Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do ICH – *Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*, 1996, de acordo com o objetivo do estudo.

II.4.4.2.1 Seletividade

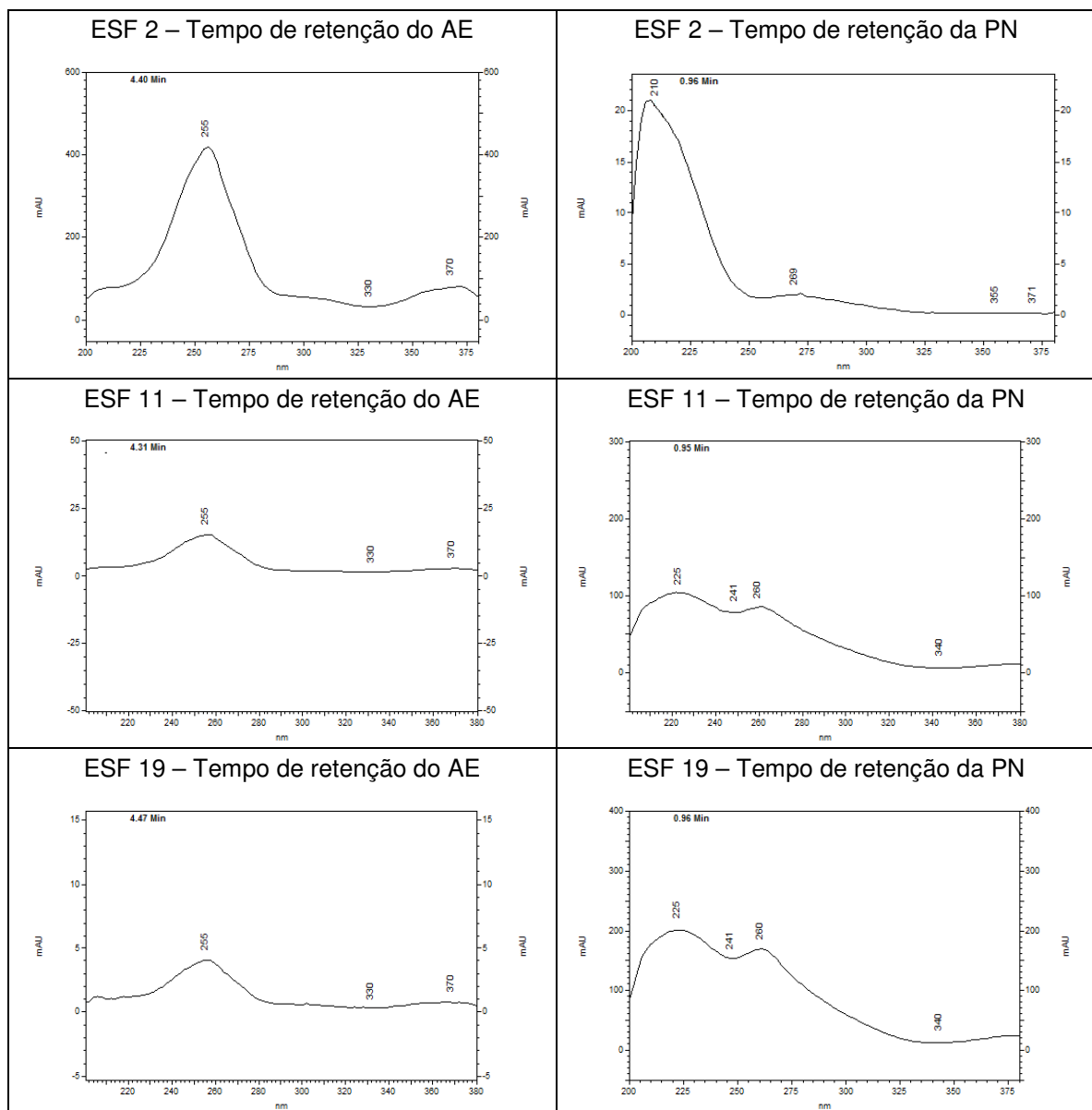
A utilização de um método analítico não seletivo pode levar a obtenção de concentrações maiores do que os valores reais, afetando a precisão e exatidão do método, além de comprometer seriamente a veracidade das conclusões obtidas a

partir da análise de amostras reais. A seletividade do método foi confirmada por meio da avaliação dos resultados obtidos para as soluções teste e referência nos ensaios de seletividade, e a comparação:

- a) dos cromatogramas obtidos no comprimento de onda selecionado para a quantificação;
- b) das áreas sob os picos nos tempos de retenção do ácido elágico e da punicalagina;
- c) das purezas cromatográficas desses picos;
- d) dos espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm.

Na análise dos ESFs 2, 11 e 19, não foram verificadas interferências próximas aos picos de ácido elágico e punicalagina, nem alterações nos máximos e mínimos de absorção nos espectros extraídos nos tempos de retenção dos analitos (apenas variação na intensidade) (**Figura 7**). Além disso, a pureza dos picos nos cromatogramas dos ESFs foi equivalente à pureza obtida para os picos dos padrões (ácido elágico = 99,01% e punicalagina = 97,85%).

Figura 7 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de ácido elágico e punicalagina para os ESFs 2, 11 e 19 a 100% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL) no ensaio de seletividade frente a matrizes com diferentes composições.



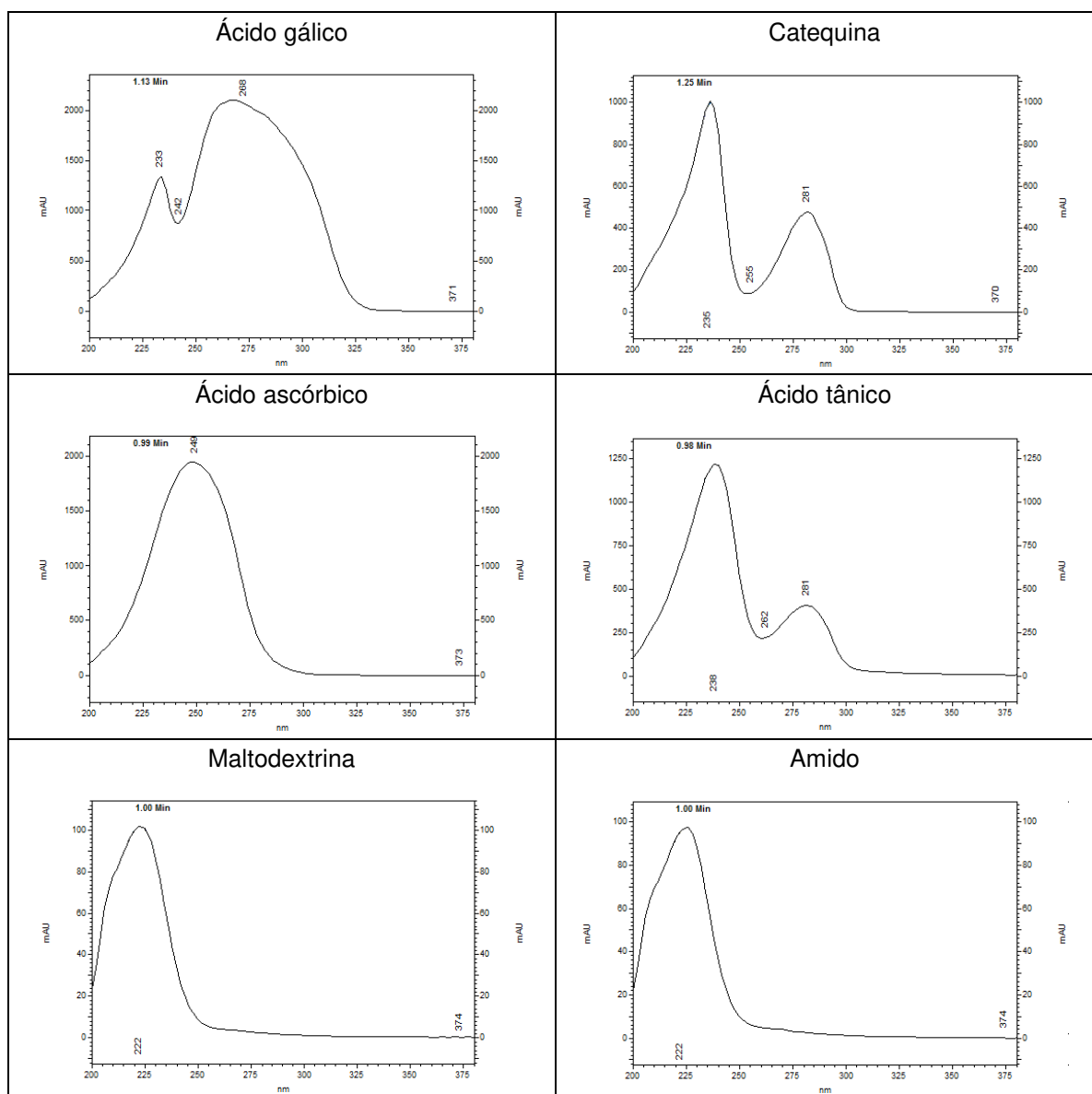
ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. UV: ultravioleta.

A análise de substâncias possivelmente presentes como constituintes dos ESFs (ácido gálico, catequina, ácido ascórbico, ácido tânico, maltodextrina e amido) permitiu a comprovação da ausência de picos nos tempos de retenção do ácido elágico e da punicalagina no cromatograma adquirido a 375 nm. A extração dos espectros de absorção nos ápices dos picos verificados no cromatograma adquirido para cada

CAPÍTULO II

substância, justificou a ausência de interferência em 375 nm, já que nesse comprimento de onda a absorção das substâncias analisadas é próxima de 0 mAU (Figura 8).

Figura 8 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de cada substância testada no ensaio de seletividade frente a possíveis componentes da matriz.



UV: ultravioleta.

Na análise de soluções de ácido elágico e punicalagina e do ESF controle (19) submetidas a condições de estresse, os resultados foram variáveis de acordo com o agente degradante e estão resumidos na **Tabela 8**.

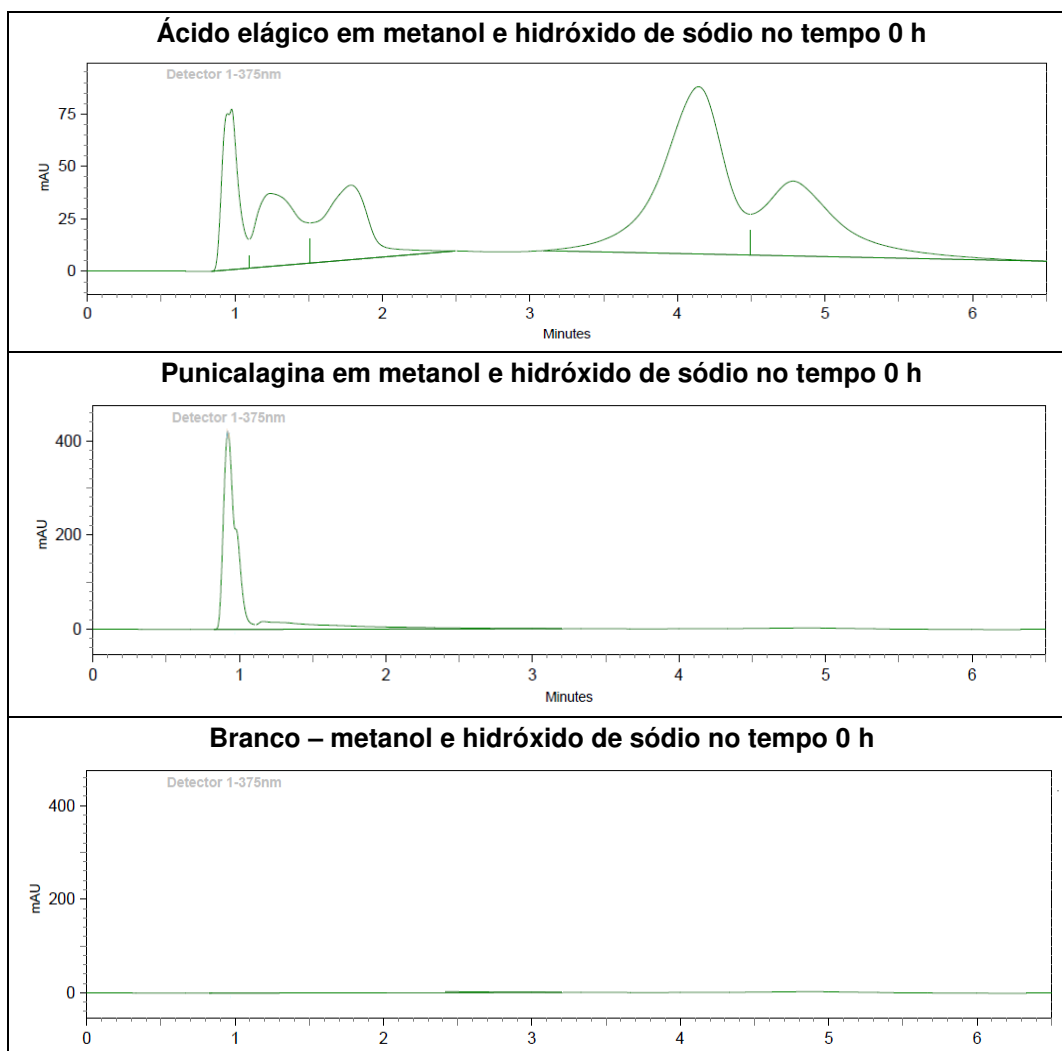
Tabela 8 – Resumo dos resultados obtidos na avaliação da degradação de ácido elágico, punicalagina e do ESF controle (19) sob condições de estresse.

Parâmetro	Condições otimizadas
Ácido elágico	
Degradação neutra, ácida e por oxidação	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Não foram observadas variações significativas nos formatos dos picos em todos os tempos avaliados. As áreas mantiveram-se praticamente constantes entre 0 h e 7 h (CVs% menores que 5%), havendo aumento em 24 h e redução na última leitura (após aquecimento – 48 h) em relação ao tempo 0 h (CVs% entre 8% e 64%). ▸ A pureza dos picos e os espectros de absorção foram semelhantes em todos os tempos. ▸ Cores da soluções: incolor (levemente marrom).
Degradação básica	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Desde o tempo 0 h foi verificada a alteração de perfil cromatográfico com formação de picos próximos ao tempo de retenção do ácido elágico e da punicalagina. Entretanto, no tempo de retenção do ácido elágico não houve alteração nos espectros de absorção (formato e valores máximos e mínimos), apenas redução de intensidade. A pureza de pico também não foi alterada. Em 24 h e 48 h não houve pico de ácido elágico. ▸ Cor da solução: marrom escuro.
Punicalagina	
Degradação neutra, ácida e por oxidação	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Não foram observadas variações significativas nos formatos dos picos em todos os tempos avaliados, exceto na degradação por oxidação em 48 h, onde houve formação de discreta cauda no pico. As áreas mantiveram-se praticamente constantes entre 0 h e 7 h (CVs% menores que 5%), havendo aumento em 24 h e redução na última leitura (após aquecimento – 48 h) em relação ao tempo 0 h (CVs% entre 8% e 64%). ▸ A pureza dos picos e os espectros de absorção foram semelhantes em todos os tempos. ▸ Cores da soluções: incolor (levemente amarela).
Degradação básica	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Desde o tempo 0 h foi verificada a alteração nos espectros de absorção (formato, valores máximos e mínimos) e a deformação do pico da punicalagina, havendo aumento dessa deformação e queda de área com o tempo. A pureza de pico ficou reduzida, principalmente em 24 h e 48 h. ▸ Cor da solução: alaranjado escuro.
ESF 19	
Degradação neutra, ácida, básica e por oxidação	<ul style="list-style-type: none"> ▸ O ESF 19 apresentou o mesmo perfil verificado para os padrões de ácido elágico e punicalagina. ▸ Cores das soluções: incolor nas degradações neutra, ácida e por oxidação e amarelo escuro na degradação básica.

ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

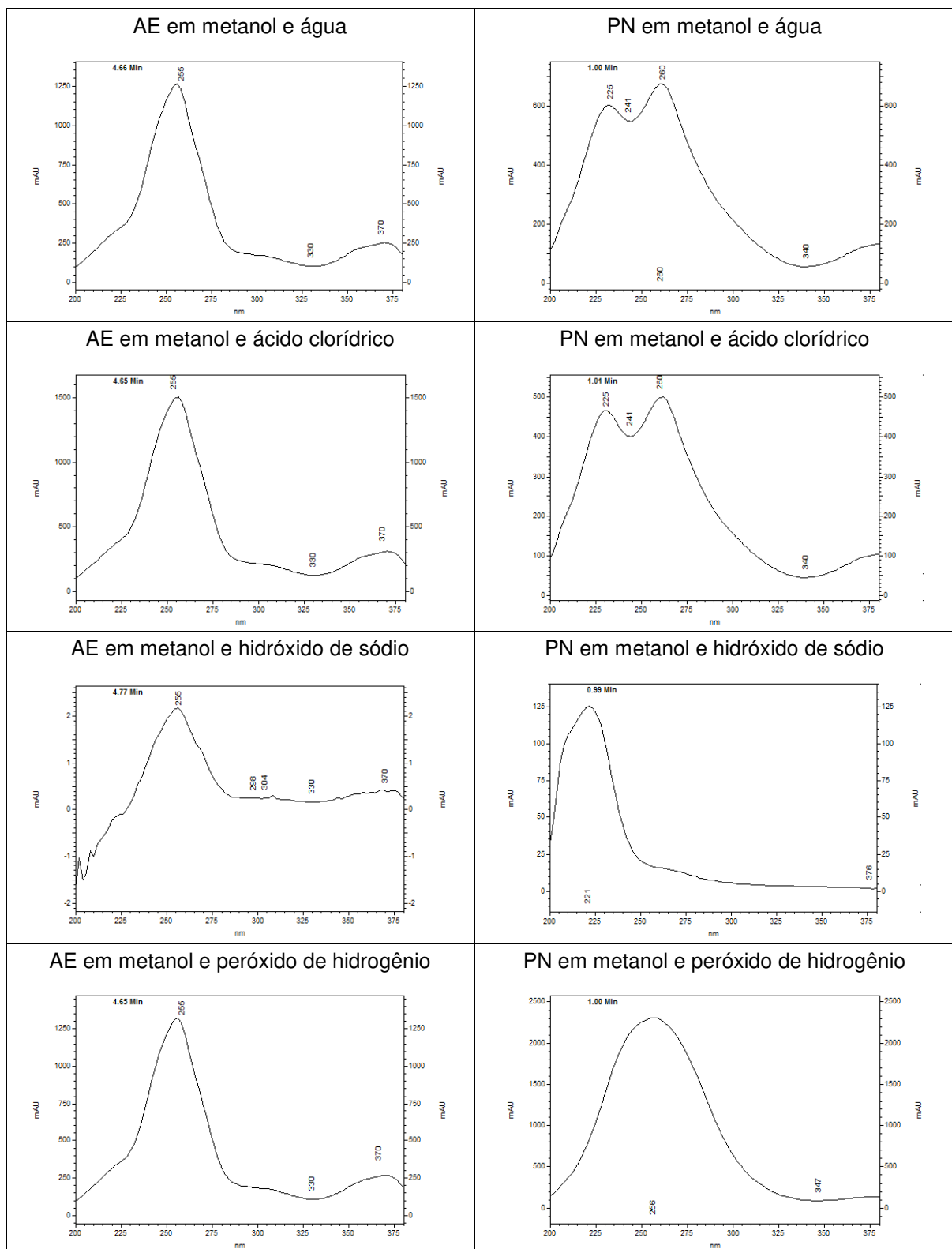
Foi possível verificar, com o estudo de degradação, que a manutenção de pH neutro ou ácido, e de temperaturas amenas, é determinante para a estabilidade dos analitos e manutenção da seletividade do método. Isso porque o aquecimento e o uso de solução básica levaram à: (1) redução da área dos picos de ácido elágico e punicalagina; (2) formação de outros picos próximos aos tempos de retenção dos analitos (para a degradação básica); (3) redução da pureza dos picos; e (4) alteração dos espectros de absorção. Além disso, o tempo de manutenção dos analitos em solução também impacta na estabilidade, de modo que as soluções devem ser preparadas no dia da análise. Isso porque em 24 h ocorre alteração da intensidade das áreas, mesmo na presença de apenas metanol:água (10:1, v/v), como solvente. As amostras branco, contendo apenas metanol e agentes degradantes não apresentaram picos nos tempos de retenção dos analitos no cromatograma adquirido a 375 nm. Como exemplo da pior condição obtida no estudo de degradação, os cromatogramas obtidos a 375 nm para as soluções de ácido elágico e punicalagina em metanol e hidróxido de sódio 1 mol/L no início do teste (tempo 0 h) estão representados na **Figura 9**.

Figura 9 – Cromatogramas obtidos a 375 nm no estudo de degradação para as soluções de ácido elágico e punicalagina em metanol e hidróxido de sódio 1 mol/L no início do teste (tempo 0 h) e para a amostra branco nas mesmas condições.



A verificação de mesmo perfil para o ESF 19 (mesmas alterações para ácido elágico e punicalagina), confirmou o fato descrito anteriormente, de que a matriz não interfere na detecção dos analitos. Os espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de ácido elágico e punicalagina para as soluções do ESF 19 nas diferentes condições de estresse, no último tempo de coleta (após aquecimento – 48 h), estão representados na **Figura 10**.

Figura 10 – Espectros de absorção na região do UV de 200 a 380 nm com valores máximos e mínimos obtidos nos tempos de retenção de ácido elágico e punicalagina para as soluções do ESF 19 nas diferentes condições de estresse, no último tempo de coleta (após aquecimento – 48 h).



AE: ácido elágico. PN: punicalagina. UV: ultravioleta.

II.4.4.2.2 Linearidade da faixa de trabalho

A determinação de teores de marcadores vegetais em produtos comerciais, muitas vezes exige a utilização de amplas faixas de trabalho, já que a variabilidade encontrada é enorme. Conforme já foi relatado, esse fato ocorre com os ESFs, de modo que as concentrações de ácido elágico e punicalagina podem ser bastante distintas. A utilização de métodos analíticos com amplas faixas de concentração (duas ou mais ordens de magnitude), muitas vezes resulta em variâncias diferentes para níveis de concentração baixos e altos, afetando a regressão linear.

Para elaboração das equações que representam a relação entre as respostas do instrumento e as concentrações conhecidas dos analitos, foi priorizado o modelo de regressão linear mais simples possível, sendo: $y = ax + b$ sem fator de ponderação, tanto para ácido elágico, quanto para punicalagina, em que y corresponde à área sob os picos dos analitos, a ao coeficiente angular, x à concentração nominal de ácido elágico ou punicalagina e b ao coeficiente linear. Esse modelo foi aplicado para as faixas de concentração de (1,5; 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 µg/mL equivalentes a 3, 30, 60, 90, 120% da concentração de trabalho dos ESFs) para ácido elágico e (1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 µg/mL equivalentes a 3, 5, 10, 20, 30% da concentração de trabalho dos ESFs) para punicalagina.

Mesmo com amplitude da faixa de trabalho utilizada para ácido elágico, a qual inclui três ordens de magnitude, não houve necessidade de uso de um fator de ponderação. A linearidade das faixas de trabalho de 3% a 120% (1,5 a 60,0 µg/mL) e 3% a 30% (1,5 a 15,0 µg/mL) da concentração de trabalho dos ESFs (50 µg/mL) para ácido elágico e punicalagina, respectivamente, foi confirmada após aprovação em análise estatística a um nível de significância de 5% de acordo com procedimento proposto por Souza e Junqueira (2005) (**Tabela 9**), além obtenção de valores maiores que 0,990 para o coeficiente de correlação (r) (**Figura 11**). Os dados obtidos para construção das curvas de calibração de ácido elágico e punicalagina estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 9 – Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários a um nível de significância de 5%.

Ácido elágico			
Premissa	Especificação	Resultado	Conclusão
Outliers – Teste de resíduo padronizado de <i>Jackknife</i>	$ J_{ei} > J_{crítico}$	Nenhum ponto com $ J_{ei} > J_{crítico}$	Não há <i>outliers</i>
Normalidade – Teste de <i>Ryan-Joiner</i>	$R_{eq} \geq R_{crítico}$	$R_{eq} = 0,9783$ $R_{crítico} = 0,9383$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Independência dos resíduos – Teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$	$d_u = 1,3596$ $d_{calculado} = 1,7319$ $4-d_u = 2,6404$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Homocedasticidade – Teste de <i>Levene</i> modificado por <i>Brown e Forsythe</i>	$t_L \leq t_{crítico}$	$t_L = 0,7539$ $t_{crítico} = 2,1604$	Há homocedasticidade entre os resíduos
Punicalagina			
Premissa	Especificação	Resultado	Conclusão
Outliers – Teste de resíduo padronizado de <i>Jackknife</i>	$ J_{ei} > J_{crítico}$	Nenhum ponto com $ J_{ei} > J_{crítico}$	Não há <i>outliers</i>
Normalidade – Teste de <i>Ryan-Joiner</i>	$R_{eq} \geq R_{crítico}$	$R_{eq} = 0,9667$ $R_{crítico} = 0,9383$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Independência dos resíduos – Teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$	$d_u = 1,3596$ $d_{calculado} = 1,6256$ $4-d_u = 2,6404$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Homocedasticidade – Teste de <i>Levene</i> modificado por <i>Brown e Forsythe</i>	$t_L \leq t_{crítico}$	$t_L = 0,8250$ $t_{crítico} = 2,1604$	Há homocedasticidade entre os resíduos

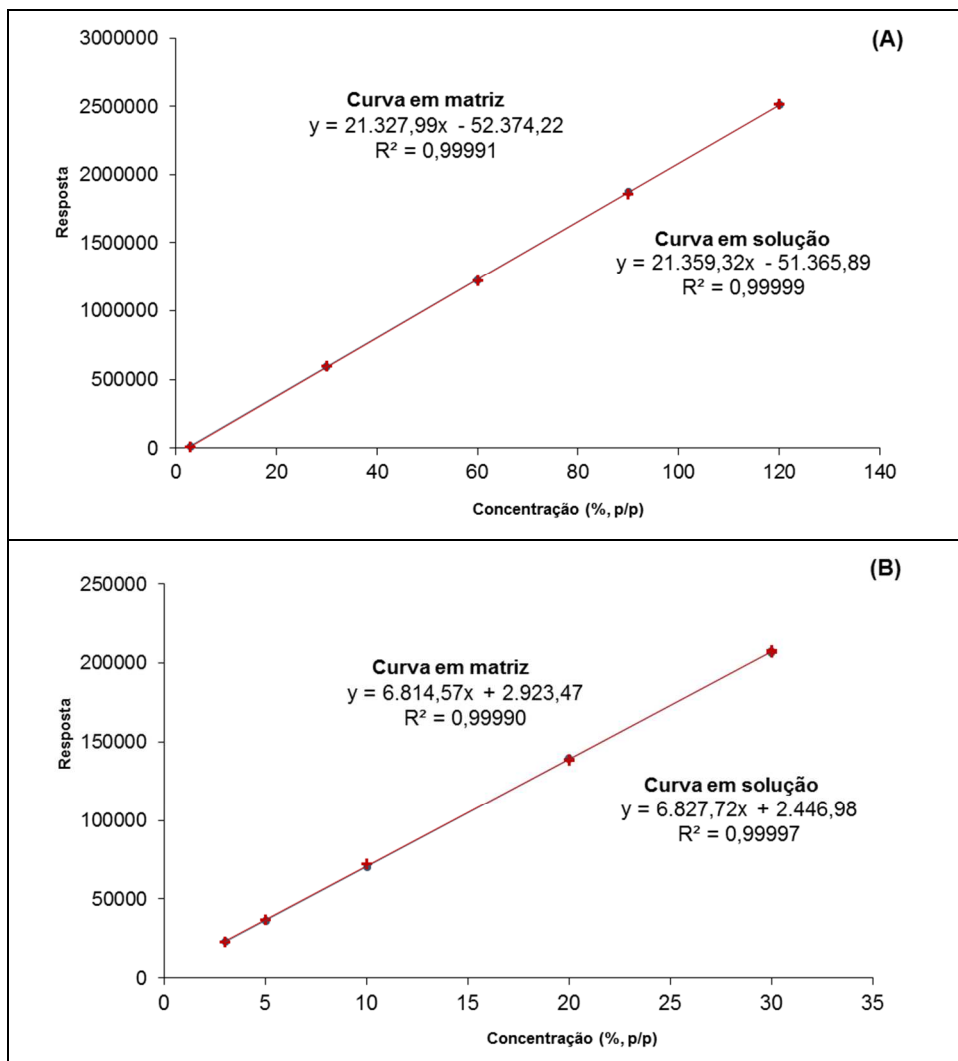
Tabela 10 – Dados obtidos para construção das curvas de calibração de ácido elágico e punicalagina.

Ácido elágico					Punicalagina				
Conc. nominal (%)	Conc. Experimental (%)	Conc. Média (%)	CV (%)	Exatidão (%)	Conc. nominal (%)	Conc. Experimental (%)	Conc. Média (%)	CV (%)	Exatidão (%)
3	2,97	2,98	0,39	99,22	3	3,03	3,02	0,94	100,63
	2,97					2,99			
	2,99					3,04			
30	30,07	30,18	0,36	100,60	5	4,93	4,97	1,09	99,35
	30,17					5,03			
	30,29					4,95			
60	59,82	59,80	0,04	99,66	10	10,01	9,98	0,56	99,79
	59,78					9,92			
	59,78					10,01			
90	90,12	89,96	0,23	99,96	20	20,06	20,07	0,05	100,36
	89,72					20,07			
	90,05					20,08			
120	120,07	120,09	0,04	100,07	30	30,03	29,96	0,20	99,87
	120,05					29,92			
	120,14					29,94			

CV%: coeficiente de variação.

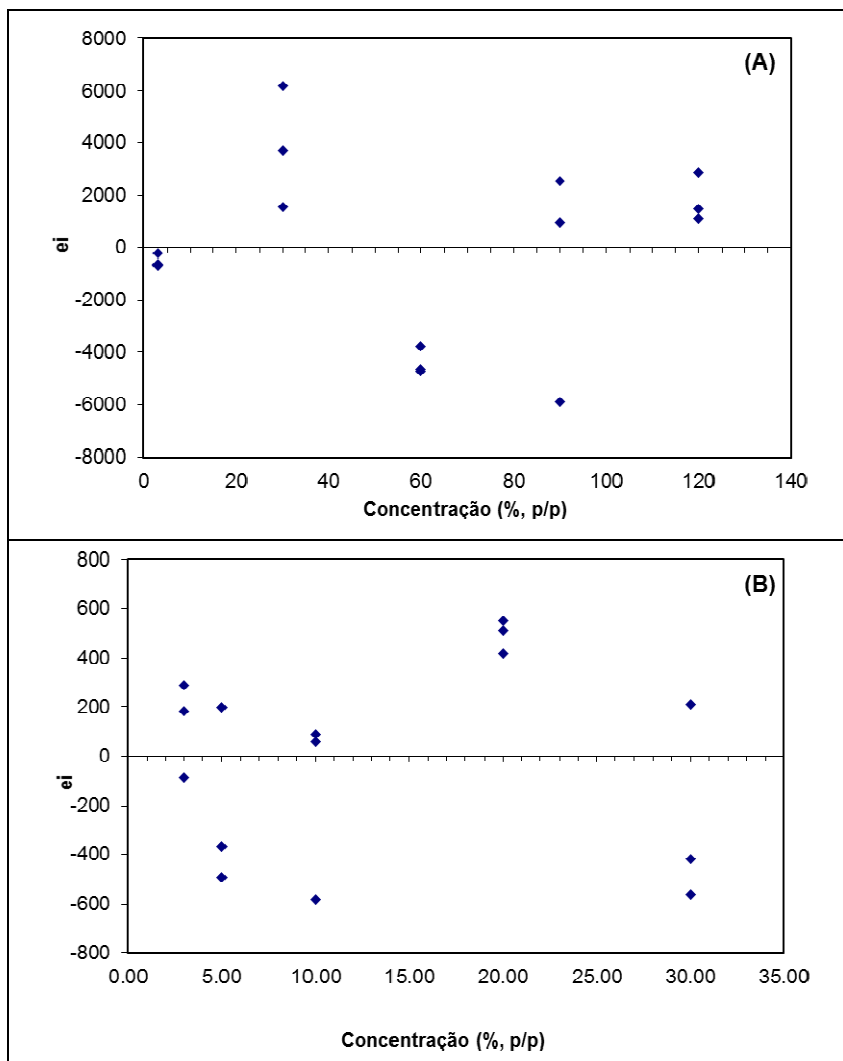
Diantes da aprovação dos resultados em relação às premissas, o MMQO foi aplicado aos dados, obtendo-se as equações das retas e os coeficientes de determinação e de correlação. A representação gráfica dessas curvas e da dispersão dos resíduos estão apresentadas nas **Figuras 11 e 12**, sendo possível verificar uma distribuição aleatória dos pontos, com ausência de qualquer tendência. Com a realização da ANOVA, foi possível verificar que a regressão é significativa e não há desvio da linearidade significativo, confirmando a adequação dos dados ao modelo linear.

Figura 11 – Curvas analíticas em matriz e em solução obtidas na validação do método por CLAE-UV para determinação dos teores de ácido elágico (A) e punicalagina (B) em ESFs.



ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

Figura 12 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de ácido elágico (A) e punicalagina (B).



||.4.4.2.3 Efeito matriz

Com a análise dos resultados obtidos por meio do teste t de Student, foi possível verificar que a matriz vegetal não afeta a inclinação e o intercepto da curva ($t_{\text{inclinação AE}} (0,53)$, $t_{\text{intercepto AE}} (0,23) < t_{\text{crítico}} (2,11)$ e $t_{\text{inclinação PN}} (0,60)$, $t_{\text{intercepto PN}} (1,29) < t_{\text{crítico}} (2,09)$), demonstrando a ausência de efeito de matriz rotacional e translacional.

A avaliação destes dois tipos de efeito matriz é essencial para garantir que, durante a aplicação do método de análise dos ESFs comerciais, amostras com altas concentrações de ácido elágico ou punicalagina não sejam sub ou superestimadas

devido ao aumento do efeito matriz, indicando que os possíveis interferentes presentes na matriz não influenciaram significativamente na detecção de ácido elágico e punicalagina e não reagiram com os analitos produzindo novas substâncias capazes de afetar a inclinação e o intercepto da curva (**Figura 11**). (BRÊTAS *et al.*, 2016). Com isso, a matriz não afeta a precisão, a exatidão, a robustez e a confiabilidade geral do método ao longo do intervalo de concentração utilizado no estudo.

II.4.4.2.4 Limites de quantificação e de detecção

Os valores dos LIQs e LIDs determinados por meio do desvio padrão do intercepto com o eixo Y e da inclinação média das 3 curvas de calibração, bem como os valores das razões sinal/ruído nas menores concentrações analisadas (0,1%; 0,2% e 0,4%), estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Valores dos limites inferiores de detecção e de quantificação determinados na validação.

Limites	AE		PN	
	%	µg/mL	%	µg/mL
LID	0,80	0,40	0,85	0,43
LIQ	2,66	1,33	2,74	1,37
Razão sinal/ruído a 3% (1,5 µg/mL)	63:1		84:1	
Razão sinal/ruído a 0,4% (0,2 µg/mL)	11:1		13:1	
Razão sinal/ruído a 0,1% (0,05 µg/mL)	4:1		5:1	

AE: ácido elágico. LID: limite inferior de detecção. LIQ: limite inferior de quantificação. PN: punicalagina.

Conforme pode ser observado, os limites determinados foram inferiores à menor concentração da faixa de trabalho (3% ou 1,5 µg/mL), garantindo a confiança nos resultados obtidos para ESFs com teores de ácido elágico e punicalagina próximos à menor concentração da faixa de trabalho (LIQ de trabalho). Além disso, a razão sinal/ruído a 3% (1,5 µg/mL) é 6 e 8 vezes maior que o limite preconizado (10:1) para o LIQ para ácido elágico e punicalagina, respectivamente, e o LIQ determinado experimentalmente (aproximadamente 0,4%) é 7,5 vezes menor que o LIQ de trabalho.

O método proposto para quantificação dos dois marcadores ativos em ESFs pode ser utilizado para detectar ácido elágico a 0,80% (0,40 µg/mL) e punicalagina a 0,85% (0,43 µg/mL) com confiança, de acordo com o cálculo. Entretanto, de acordo com a razão sinal/ruído esse valor é ainda menor (aproximadamente 0,1%).

||4.4.2.5 Precisão

Tanto a Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017, da ANVISA, quanto a Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014, da ANVISA, recomendam que o valor máximo aceitável de CV% deve ser definido de acordo com a finalidade e a variabilidade intrínseca ao método empregado, com a concentração do analito na amostra e com o tipo e complexidade da matriz. A Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014, da ANVISA, que traz orientações específicas para fitoterápicos, indica que os valores de CV% devem ser de, no máximo, 15%, como para métodos bioanalíticos, devido à complexidade da matéria-prima vegetal. Desse modo, o método analítico foi considerado preciso para quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina em ESFs, uma vez que todos os valores de CV% obtidos para as diferentes matrizes avaliadas são inferiores a 2% (**Tabelas 12 e 13**).

Vale a pena destacar que todas as amostras foram preparadas individualmente desde a pesagem, e não por diluições feitas a partir de uma mesma solução. Ainda com o aumento da variabilidade intrínseca a esse procedimento, os CV% tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária são inferiores a 2% (**Tabelas 12 e 13**). Embora o ensaio de precisão tenha sido realizado com três ESFs comerciais (2, 11 e 14) e com o ESF controle (19), foram utilizados para o cálculo dos CV% apenas os extratos com concentrações de ácido elágico ou punicalagina maiores que o LIQ. Desse modo, a precisão do método para quantificação de ácido elágico foi avaliada com os ESFs 2, 11 e 19 (**Tabela 12**), e para quantificação de punicalagina com os ESFs 11, 14 e 19 (**Tabela 13**).

Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da precisão com três matrizes para ácido elágico (ESFs 2, 11 e 19).

Corrida	ESF 2		ESF 11		ESF 19	
	Repetibilidade					
	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída
1	24,931	0,86	2,414	1,36	1,520	0,68
2	24,900	0,83	2,413	1,53	1,521	0,34
3	24,912	0,99	2,409	1,62	1,518	0,48
Precisão intermediária	24,914	0,84	2,412	1,42	1,520	0,50

AE: ácido elágico. CV%: coeficiente de variação. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

Tabela 13 – Resultados obtidos na análise da precisão com três matrizes para punicalagina (ESFs 11, 14 e 19).

Corrida	ESF 11		ESF 14		ESF 19	
	Repetibilidade					
	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída	Conc. média (µg/mL)	CV% intracorrída
1	6,060	1,38	1,713	1,69	9,140	1,43
2	6,060	1,35	1,723	1,03	9,127	1,14
3	6,066	1,10	1,703	1,22	9,170	1,48
Precisão intermediária	6,062	1,21	1,713	1,36	9,145	1,29

CV%: coeficiente de variação. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

||4.4.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi confirmada pela obtenção de valores de recuperação dentro da faixa de 98% a 102%, conforme apresentado na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Resultados da avaliação da exatidão do método por meio da recuperação de ácido elágico e punicalagina adicionados à matriz (ESF 11) a 50% da concentração de trabalho.

Ácido elágico				
Conc. nominal (%)	Conc. Experimental (%) ¹	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
3	3,04	101,39	100,18	1,22
	2,97	98,94		
	3,01	100,20		
60	60,31	100,51	99,57	0,85
	59,59	99,32		
	59,33	98,88		
120	120,66	100,55	99,95	0,65
	119,12	99,27		
	120,04	100,04		
Punicalagina				
Conc. nominal (%)	Conc. Experimental (%) ¹	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
3	2,98	99,19	99,61	1,22
	2,96	98,66		
	3,03	100,97		
10	9,97	99,74	100,21	0,75
	10,11	101,08		
	9,98	99,81		
30	29,82	99,39	99,74	0,31
	29,96	99,86		
	29,99	99,97		

¹Concentração experimental (%) = $\frac{\text{Concentração}_{\text{Amostra com AE e PN}}}{\text{Concentração}_{\text{Amostra a 50\%}}}$

CV%: coeficiente de variação. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

Além disso, como pode ser observado na **Tabela 10**, também foram obtidos valores dentro da faixa de 98% a 102% para a relação entre a concentração média determinada experimentalmente a partir da curva de calibração e a concentração teórica, o que reforça a exatidão adequada do método para quantificação de ácido elágico e punicalagina em ESFs.

4.4.2.7 Robustez e adequabilidade do sistema

Para todos os parâmetros avaliados na robustez (estabilidade da solução (24 h), pH da fase móvel ($\pm 0,1$), composição da fase móvel ($\pm 1\%$ de metanol), fabricantes de metanol (Sigma- Aldrich e JTBaker), temperatura da coluna (± 1 °C) e fluxo ($\pm 0,1$

mL/min)), não houve alterações estatisticamente significativas nos teores determinados (*valor-P* > 0.05), exceto para o tipo de filtro. Nesse caso, tanto para ácido elágico (*valor-P* 1.43×10^{-07}) quanto para punicalagina (*valor-P* 7.64×10^{-09}) houve uma redução expressiva nos teores (51.84% e 59.53% de redução para EA e punicalagina, respectivamente), indicando que o filtro de PVDF retém parte dos analitos, quando comparado ao filtro de RC.

Em relação à adequabilidade do sistema foram observadas alterações estatisticamente significativas com *valor-P* < 0.05 apenas para modificações em que houve alteração nos tempos de retenção (composição da fase móvel ($\pm 1\%$ de metanol), fabricantes de metanol (Sigma- Aldrich e JTBaker), temperatura da coluna ($\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) e fluxo ($\pm 0,1\text{ mL/min}$)). Esse fato é completamente plausível, pois a alteração do tempo de retenção leva à modificação de parâmetros relacionados, tais como resolução dos picos (R_s), fator de retenção (k), retenção relativa (r) e fator de assimetria (A_s). Entretanto, ainda assim, os valores obtidos para esses parâmetros em cada uma das condições testadas ainda foram satisfatórios, estando dentro dos limites permitidos. Para a razão sinal/ruído (S/N) houve alteração estatisticamente significativa com *valor-P* < 0.05 apenas para o tipo de filtro, já que foi a única condição em que houve redução significativa das áreas sob os picos. O número de pratos teóricos (N) foi superior a 2500 em todas as condições testadas, não sofrendo variações significativas. A precisão do método foi confirmada em todas as modificações, sendo obtidos valores de DPR inferiores a 2% em todos os casos (UNITED STATES, 1994).

Desse modo, o método é robusto sob as variações avaliadas nesse ensaio, não impactando na determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina em ESFs. A única exceção é o tipo de filtro, sendo esse parâmetro crítico para a confiabilidade nos resultados obtidos, impactando diretamente na exatidão do método.

II.4.4.3 Aplicação do método desenvolvido e validado na análise dos ESFs

A quantificação simultânea de ácido elágico e punicalagina nos 18 ESFs comerciais (1 a 18) e no ESF controle (19) foi realizada após o desenvolvimento e confirmação

da qualidade do método analítico por meio da validação. O método foi aprovado em todos os parâmetros avaliados, sendo considerado preciso, exato, linear e seletivo. Todos os CV% obtidos para as médias das concentrações dos ESFs, foram inferiores a 1,5%. Os teores de ácido elágico e punicalagina determinados na análise dos ESFs por CLAE-UV, utilizando o método analítico desenvolvido e validado estão descritos na **Tabela 15** e, como exemplo, os cromatogramas obtidos a 375 nm na análise dos ESFs (1, 2, 11 e 19), estão representados na **Figura 13**.

Tabela 15 – Teores de ácido elágico e punicalagina determinados na análise dos ESFs por CLAE-UV, utilizando o método analítico desenvolvido e validado. Teores declarados nos laudos e cores dos ESFs.

ESFs	Cor dos ESFs	Teor declarado no laudo (% p/p)		Teores calculados por CLAE-UV			
		AE	Taninos Totais	AE (% p/p)	CV%	PN (% p/p)	CV%
1	Cinza	90,77	-	98,37	0,35	<LIQ e >LID	-
2 ¹	Cinza	44,91	-	46,74	0,46	<LIQ e >LID	-
3 ¹	Cinza	44,91	-	52,93	0,71	<LIQ e >LID	-
4	Creme escuro	44,06	-	60,11	0,35	<LIQ e >LID	-
5	Cinza	40,86	-	44,80	0,25	<LIQ e >LID	-
6 ²	Cinza	40,84	-	66,57	1,04	<LIQ e >LID	-
7 ²	Cinza	40,84	-	45,14	0,82	<LIQ e >LID	-
8 ³	Cinza	40,80	-	48,48	0,40	<LIQ e >LID	-
9 ³	Cinza	40,80	-	49,16	0,32	<LIQ e >LID	-
10	Cinza	40,70	-	44,08	0,58	<LIQ e >LID	-
11	Marrom	15,50	-	4,48	0,58	11,25	0,10
12	Marrom	-	9,37	<LIQ e >LID	-	3,17	1,16
13	Marrom	-	9,37	<LIQ e >LID	-	3,47	0,77
14 ⁴	Marrom	-	7,04	<LIQ e >LID	-	3,19	1,14
15 ⁴	Marrom	-	7,04	<LIQ e >LID	-	3,47	1,27
16	Amarelo	-	-	<LIQ e >LID	-	4,88	1,12
17 ⁵	Amarelo	-	-	<LIQ e >LID	-	4,73	1,48
18 ⁵	Amarelo	-	-	<LIQ e >LID	-	3,02	1,38
19 ⁶	Marrom	-	-	3,32	0,10	19,97	0,16

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

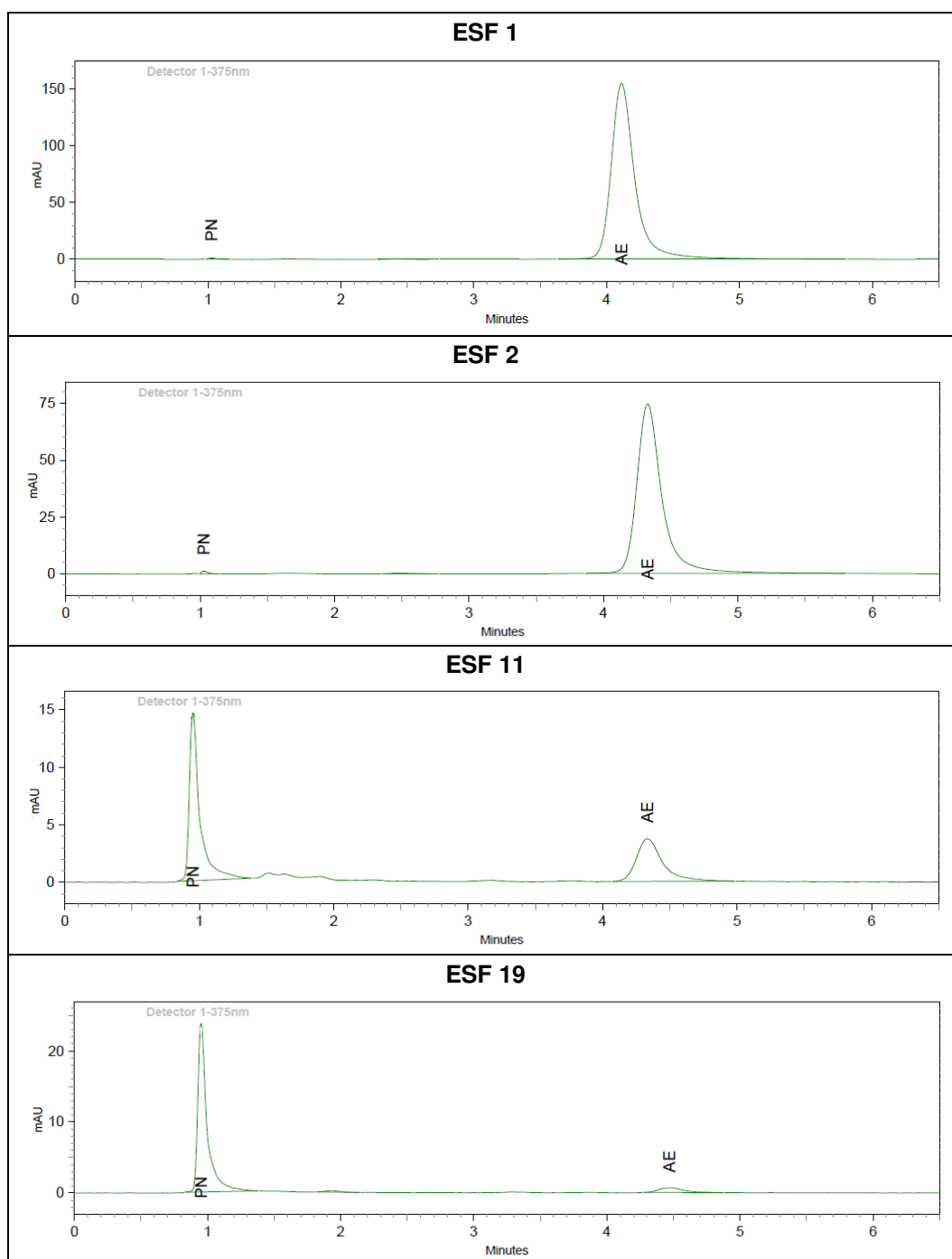
⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

⁵Extratos fabricados pela mesma indústria, mas com excipientes diferentes: extrato 17 com amido e extrato 18 com maltodextrina. O laudo não foi disponibilizado.

⁶Extrato controle.

AE: ácido elágico. CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector espectrofotométrico na região do ultravioleta. CV%: coeficiente de variação. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. LID: limite inferior de detecção. LIQ: limite inferior de quantificação. PN: punicalagina.

Figura 13 – Cromatogramas obtidos a 375 nm na análise dos ESFs (1, 2, 11 e 19) a 100% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL).



ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

Conforme era esperado, os teores dos marcadores ativos variaram amplamente entre os ESFs comerciais: de 66,57% e 11,25% (p/p) (excluindo o resultado obtido para o ESF 1), para ácido elágico e punicalagina, respectivamente, a valores entre o LIQ e o LID ($LID < \%AE - \%PN < LIQ$). Embora os teores de ácido elágico tenham sido divergentes dos valores emitidos pelos fornecedores (valores descritos nos laudos),

houve concordância entre a emissão de valores para ácido elágico pelas empresas e a verificação de teores acima do LIQ de ácido elágico. Isso porque, em todos os ESFs com teor de ácido elágico declarado nos laudos e, em apenas nesses extratos, foi possível quantificar esse marcador. Nos ESFs em que foi fornecido o valor de taninos totais, ou que não foi informado os teores de marcadores, apenas a punicalagina foi quantificada. Além disso, o único ESF comercial que apresentou teor de punicalagina mais próximo ao valor obtido para o ESF controle (19,97%, p/p de punicalagina), foi o de número 11 (11,25%, p/p de punicalagina).

Esse fato, aliado ao teor de ácido elágico inferior a 3-5% (p/p), valor indicado por Mertens-Talcot *et al.* (2006) e por Martin *et al.* (2009) como máximo obtido em processos de produção adequados, é um forte indício da qualidade desse produto, indicando sua autenticidade e integridade em relação à manutenção das características fitoquímicas naturais do pericarpo do fruto da *Punica granatum* L.. Em todos os ESFs de cor marrom ou amarela (cor característica da matéria-prima vegetal), foram obtidos baixos teores de ácido elágico, corroborando a hipótese de que ESFs com elevados teores desse marcador (maior ou igual a 8 vezes o limite indicado) e cor cinza, podem ter sido adulterados com adição de ácido elágico proveniente de outras fontes naturais.

De acordo com a Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, a Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014, da ANVISA, e com o Guia de Qualidade de Produtos Medicinais naturais da *European Medicines Agency* (EMA) – *Guideline on quality of herbal medicinal products*, 2011, a obtenção do perfil cromatográfico de fitoterápicos, é uma ferramenta importante e fundamental para identificação e verificação de adulterações. Além disso, ensaios de controle de qualidade para fitoterápicos devem permitir a determinação qualitativa e quantitativa da composição em termos de substâncias ativas, incluindo marcadores com atividade terapêutica conhecida. No caso de produtos com vários compostos ativos, os principais devem ser especificados e determinados quantitativamente (EMA, 2011). Esse é o caso dos ESFs, em que os principais marcadores com atividades biológicas comprovadas são o ácido elágico e a punicalagina, sendo fundamental a verificação da presença desses dois

constituintes, e não apenas de um deles, como é apresentado nos laudos dos fornecedores.

Mueller, Hobiger e Jungbauer (2010) e Lansky (2006) confirmaram a importância da presença dos vários constituintes de extratos de *Punica granatum* L. para obtenção das atividades biológicas almejadas (anti-inflamatória e antitumoral), de modo que ESFs com 40% (p/p) de ácido elágico foram inativos. Esse fato também foi avaliado nesse trabalho (CAPÍTULO III) corroborando as conclusões obtidas por Mueller, Hobiger e Jungbauer (2010) e Lansky (2006).

A orientação de guias para padronização de produtos naturais com determinados marcadores ativos, como a Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014, da ANVISA, é de que as empresas podem utilizar misturas de lotes de matérias-primas e/ou adição de excipientes para manutenção da concentração dos marcadores ativos dentro dos limites preconizados ($\pm 15\%$). Entretanto, a adição de substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais, ou ainda a associação dessas, com extratos, descaracteriza o produto, o qual deixa de ser considerado fitoterápico, sendo denominado medicamento específico. Existem normas e critérios particulares para a produção, registro e controle de qualidade de medicamentos específicos, justamente devido às diferenças entre esses produtos e ao maior risco que o aumento da concentração de uma única substância no produto pode trazer à saúde do paciente.

||.4.5 Determinação do teor de taninos totais nos ESFs por método espectrofotométrico miniaturizado

||.4.5.1 Preparo das amostras e procedimento desenvolvido

A escolha do solvente utilizado no preparo das soluções de ESFs foi realizada considerando dois fatores principais: (1) permitir a solubilização dos extratos secos; e (2) evitar a precipitação do carbonato de sódio. A completa solubilização dos extratos secos é essencial para obtenção de resultados precisos, evitando subestimar a concentração de taninos totais nas amostras. Durante o desenvolvimento do método

miniaturizado, verificou-se que os ESFs eram totalmente solubilizados em água ultrapura, de modo que esse solvente foi empregado para preparo das soluções.

Solventes orgânicos como metanol e etanol, bem como soluções hidroalcoólicas, levam à precipitação de carbonato de sódio, que tem solubilidade limitada nesses solventes, mas é solúvel em água ultrapura. Esta precipitação é extremamente prejudicial à análise, já que a reação do Folin-Ciocalteu requer pH básico para ocorrer. Além disso, a obtenção de soluções turvas em decorrência da precipitação do carbonato de sódio leva à obtenção de valores de absorvância imprecisos.

||4.5.2 Validação do método espectrofotométrico miniaturizado

A validação do método espectrofotométrico miniaturizado para quantificação de taninos totais em ESFs foi iniciada após o desenvolvimento, de modo que os resultados obtidos, e apresentados nos itens ||4.5.2.1 a ||4.5.2.1, atendem aos objetivos do estudo, estando de acordo com as recomendações da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017, da Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014 e da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, todas da ANVISA, e do Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do ICH – *Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*, 1996.

||4.5.2.1 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

Após análise estatística, o método otimizado foi considerado linear na faixa avaliada (0,19 a 7,67 µg/mL). Nenhum *outlier* foi detectado e os resultados obtidos nos testes de normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos mostraram que os resíduos estão de acordo com todas as premissas do método dos mínimos quadrados, apresentando distribuição aleatória. A regressão foi estatisticamente significativa, não sendo observada falta de ajuste ao modelo linear. O coeficiente de correlação obtido foi superior a 0,990 ($r = 0,99998$), conforme requerido pela Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA e a equação da reta foi $y = 0,11242x + 0,02405$. O LID e o LIQ foram estimados em 0,04 e 0,12 µg/mL, respectivamente.

II.4.5.2.2 Precisão e exatidão

Na análise da repetibilidade e da precisão intermediária, todos os valores de DPR obtidos foram inferiores a 2,0%, confirmando a precisão do método desenvolvido (**Tabela 16**) (GREEN, 1996). As porcentagens médias de recuperação e os valores de DPR ficaram dentro dos limites especificados, entre 98,0 e 102,0% da concentração teórica (GREEN, 1996), demonstrando uma exatidão adequada (**Tabela 17**).

Tabela 16 – Resultados obtidos na análise da precisão do método.

Amostra	Repetibilidade (n=6)	
	Teor médio de taninos totais	DPR (%)
1	2,74 µg/mL (14,27%, p/p)	1,50
2	2,71 µg/mL (14,15%, p/p)	1,59
3	2,72 µg/mL (14,17%, p/p)	1,36
Precisão intermediária (n=18)	2,72 µg/mL (14,20%, p/p)	1,44

DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 17 – Resultados obtidos na análise da exatidão do método.

Nível	Recuperação média (%)	DPR (%)
Baixo (0,19 µg/mL)	99,25	0,46
Médio (3,71 µg/mL)	99,28	0,25
Alto (7,67 µg/mL)	99,06	0,12

DPR: Desvio padrão relativo.

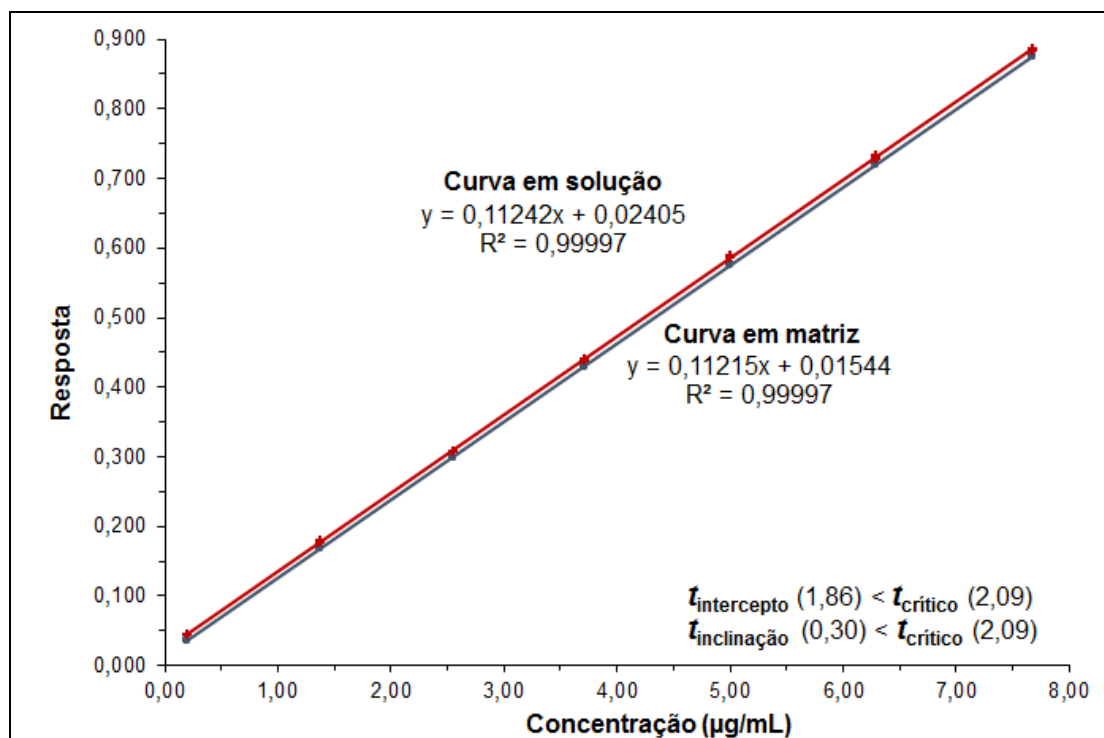
Além disso, na determinação da relação entre as concentrações médias determinadas experimentalmente pelo método espectrofotométrico miniaturizado e pelo método tradicional farmacopeico, foram obtidos valores dentro da faixa de 98% a 102%. Esse resultado reforça a confirmação de exatidão adequada do método miniaturizado para quantificação de taninos totais em ESFs e assegura a equivalência dos resultados obtidos para os dois métodos, indicando que o método miniaturizado pode ser aplicado em substituição ao método tradicional, sem detrimento da qualidade dos resultados emitidos.

II.4.5.2.3 Efeito matriz e seletividade

A partir da análise dos resultados obtidos por meio do teste *t* de Student, foi possível verificar que a matriz vegetal não afeta a inclinação e o intercepto da curva ($t_{\text{inclinação}} (0,30)$, $t_{\text{intercepto}} (1,86) < t_{\text{crítico}} (2,09)$), demonstrando a ausência de efeito de matriz rotacional e translacional. Assim como discutido no item II.4.4.2.3, esse procedimento permite a avaliação com segurança do efeito matriz constante ao longo do intervalo de concentração (efeito matriz translacional) e do efeito da matriz influenciado por variações na concentração dos analitos (efeito matriz rotacional). A avaliação destes dois tipos de efeito matriz é essencial para garantir que, durante a aplicação do método de análise dos ESFs comerciais, amostras com altas concentrações de taninos não sejam sub ou superestimadas devido ao aumento do efeito matriz (BRÊTAS *et al.*, 2016).

Ou seja, esse estudo indica que os possíveis interferentes presentes na matriz não influenciaram significativamente a detecção de taninos e não reagiram com os analitos para produzir novas substâncias capazes de afetar a inclinação e o intercepto da curva (**Figura 14**). Desse modo, esses resultados denotam que a matriz não afeta a precisão, a exatidão, a robustez e a confiabilidade geral do método ao longo do intervalo de concentração utilizado no estudo. A ausência de efeito matriz também assegura a seletividade do método, pois na análise de pirogalol na presença de matriz e, conseqüentemente, potenciais interferentes, esses parâmetros não foram alterados.

Figura 14 – Curvas analíticas em matriz e em solução obtidas na validação do método espectrofotométrico miniaturizado para determinação do teor de taninos totais em ESFs.



ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L.

||4.5.2.4 Robustez

Com os resultados obtidos com a aplicação dos testes estatísticos ANOVA e Comparações Múltiplas de Dunnett, foi possível verificar que o método desenvolvido é robusto quanto ao tempo de reação variando entre 5 e 35 minutos. Nesta faixa, a absorvância foi estável e o conteúdo de taninos totais não foi afetado. No entanto, a absorvância diminuiu após 35 minutos, levando a resultados inexatos. Assim, é fundamental que o tempo de reação seja limitado a até 35 minutos. Em relação ao tipo de água, verificou-se que esse é um parâmetro crítico para a qualidade dos resultados, uma vez que foi observada uma diferença estatisticamente significativa no teor de taninos totais quando utilizada a água destilada. Com isso, todas as soluções aquosas utilizadas no método espectrofotométrico miniaturizado devem ser preparadas em água ultrapura.

II.4.5.3 Aplicação do método espectrofotométrico miniaturizado desenvolvido e validado na análise dos ESFs

O método validado foi aplicado com sucesso na quantificação de taninos totais em 18 ESFs comerciais e no ESF controle. Os conteúdos de taninos totais obtidos para todas as amostras e expressos em $\mu\text{g/mL}$ e em % (p/p) estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Conteúdos de taninos totais obtidos para os 18 ESFs comerciais e ESF controle e principais informações contidas nos laudos fornecidos pelos fabricantes/distribuidores para comparação com os resultados obtidos.

ESFs	Cor dos ESFs	Teor declarado no laudo (% p/p)		Teor de taninos totais determinado		
		Taninos totais	AE	$\mu\text{g/mL}$	% (p/p)	DPR (%)
1	Cinza	-	90,77	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	1,06
2 ¹	Cinza	-	44,91	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	1,04
3 ¹	Cinza	-	44,91	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	0,31
4	Creme escuro	-	44,06	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	0,47
5	Cinza	-	40,86	0,69	3,58	1,16
6 ²	Cinza	-	40,84	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	0,98
7 ²	Cinza	-	40,84	< LID	< LID	0,03
8 ³	Cinza	-	40,80	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	0,38
9 ³	Cinza	-	40,80	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	0,42
10	Cinza	-	40,70	< LIQ e > LID	< LIQ e > LID	1,26
11	Marrom	-	15,50	2,72	14,20	0,74
12	Marrom	9,37	-	0,62	3,26	0,44
13	Marrom	9,37	-	0,69	3,57	0,46
14 ⁴	Marrom	7,04	-	0,62	3,25	0,35
15 ⁴	Marrom	7,04	-	0,68	3,55	0,26
16	Amarelo	-	-	1,21	6,31	0,17
17 ⁵	Amarelo	-	-	1,19	6,19	0,11
18 ⁵	Amarelo	-	-	0,73	3,81	0,58
19 ⁶	Marrom	-	-	3,85	20,08	1,03

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

⁵Extratos fabricados pela mesma indústria, mas com excipientes diferentes: extrato 17 com amido e extrato 18 com maltodextrina. O laudo não foi disponibilizado.

⁶Extrato controle.

AE: ácido elágico. DPR: desvio padrão relativo. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. LID: limite inferior de detecção. LIQ: limite inferior de quantificação.

O ESF 19 (extrato controle), produzido sob condições controladas e sem qualquer adição de ácido elágico ou excipientes, é o ESF com maior teor de taninos (20,08%, p/p), os quais são os principais responsáveis pela maior parte das atividades biológicas atribuídas a esses extratos. Em contrapartida, com exceção do ESF 11, que é o ESF comercial com maior teor de taninos (14,20%, p/p), todos os demais tem baixos teores, o que pode comprometer a eficácia desses extratos, além de ser um forte indício de adulteração do produto natural com adição excessiva de excipientes ou de outras substâncias, como o ácido elágico, ou ainda indicar a ocorrência de degradação dos taninos durante o processo de produção e/ou armazenamento dos ESFs.

Para os ESFs 1 a 10, foi possível estabelecer uma relação entre o teor declarado de ácido elágico (superior a 40%, p/p) e a ausência de taninos quantificáveis pelo método validado (valores menores que o LIQ). Para os ESFs 12 a 15, com teores taninos de totais declarados nos laudos variando de 7,04% a 9,37% (p/p), os valores determinados nesse estudo foram consideravelmente inferiores (3,25% a 3,57%, p/p). Essa diferença pode ser resultado de degradação dos taninos em decorrência de armazenamento ou transporte inadequado.

Como pode ser visto na **Tabela 5** e na **Figura 3**, os ESFs possuem diferentes características, processo de produção e composição quanto ao teor de ácido elágico ou de taninos totais. Outro ponto a destacar é a correlação existente entre os teores observados e as cores dos ESFs e padrões ácido elágico e punicalagina. Os ESFs 1 a 10 (exceto ESF 4), com teores elevados de ácido elágico declarados pelos fabricantes ($\geq 40\%$, p/p) e teores de taninos não quantificáveis ($< \text{LIQ}$), possuem a mesma cor do padrão de ácido elágico (cinza). Em contrapartida, para os ESFs 11 a 18, com baixos teores de ácido elágico ou de taninos declarados nos laudos (ou nenhum valor declarado) e cor marrom ou amarela, semelhante à cor do padrão de punicalagina (amarelo), os teores de taninos totais determinados foram superiores ao LIQ. Além disso, a cor desses ESFs também é semelhante à cor do ESF controle (19) e do pericarpo do fruto de *Punica granatum* L. (amarelo quando *in natura* e marrom quando seco) (WHO, 2009). Essa associação entre o teor de taninos totais e a cor do padrão de punicalagina é significativa e relevante, já que a punicalagina é um

constituente quase exclusivo da *Punica granatum* L., originalmente presente em altas concentrações, sendo a principal substância responsável pelas atividades terapêuticas atribuídas aos produtos derivados da casca do fruto dessa planta (BORGES; CROZIER, 2012).

A análise e correlação da cor dos ESFs e de seu teor de taninos totais é extremamente importante para avaliar a qualidade desses produtos. Essa análise é essencial para o controle de qualidade dos ESFs e permite verificar sua integridade em relação à preservação das características naturais da casca do fruto da *Punica granatum* L., como a manutenção de altos teores de taninos e baixo teor de ácido elágico. O teor de ácido elágico nos ESFs obtidos em processos de produção adequados é originalmente muito baixo (3% a 5%, p/p) (MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2009) e concentrações muito acima desse nível podem ser um indício de hidrólise excessiva de elagitaninos durante o processamento e extração da casca do fruto. Outra possibilidade considerável é a adulteração com adição de ácido elágico sintético, ou ácido elágico extraído de outras fontes naturais, ou ainda adição de quantidades excessivas de excipientes.

A alta variabilidade observada nos teores de taninos entre os ESFs comerciais pode ser um indício de diferentes respostas biológicas, demonstrando a necessidade de maior atenção das agências regulatórias para padronização e controle dos fitoterápicos, a fim de manter e valorizar a composição natural dos produtos.

||.4.5.4 Comparação de custos do método tradicional farmacopeico com o método espectrofotométrico miniaturizado

O método miniaturizado desenvolvido e validado foi comparado ao método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). Embora não exista monografia para *Punica granatum* L. nesse compêndio, foi utilizado o procedimento padrão para outros extratos, uma vez que os procedimentos são muito semelhantes. Observou-se que o método desenvolvido reduziu drasticamente o custo da análise. Considerando apenas a quantidade de reagentes gastos para o preparo das soluções de PT e PNA, a redução de custo foi de 82,3% (**Tabela 19**). Além disso, a miniaturização promoveu

redução de 84,7% no consumo de energia elétrica e de 56,3% no tempo total de análise.

Tabela 19 – Comparação dos custos entre o método miniaturizado e o método padrão descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

Reagente	Quantidade utilizada		Preço	Custo por amostra	
	Farmacopeia Brasileira	Método Miniaturizado		Farmacopeia Brasileira	Método Miniaturizado
Água	60,00 mL	0,56 mL	R\$ 0,12/mL	R\$ 5,89	R\$ 0,04
Folin-Ciocalteu	2,00 mL	0,32 mL	R\$ 1,89/mL	R\$ 3,77	R\$ 0,59
Carbonato de sódio	12,00 mL	0,96 mL	R\$ 0,28/mL	R\$ 3,30	R\$ 0,28
Pó de pele	0,10 g	0,10 g	R\$ 16,90/g	R\$ 1,69	R\$ 1,69
Custo total com reagentes				R\$ 14,66	R\$ 2,59
Porcentagem de redução				82,3%	

A redução do consumo de eletricidade (84,7%) foi determinada utilizando um simulador da companhia de eletricidade de Minas Gerais – Brasil (CEMIG). Esse simulador considera a potência de cada equipamento em Watts (W) e o tempo de uso, para determinar o consumo de eletricidade em Kilowatt-hora (kWh). Assim, foi estimado o consumo em kWh para a análise de 96 amostras pelo método preconizado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) e pelo método miniaturizado, considerando a operação do Espectrofotômetro UV-1800 e do Leitor de Microplacas VersaMax™, respectivamente.

A redução no tempo total de análise (56,3%) foi calculada considerando o tempo gasto para analisar 96 amostras, desde o início do preparo da amostra, até o final da leitura da absorvância. Como o tempo de preparo da amostra é o mesmo para os dois métodos, o tempo necessário para medir a absorvância das amostras foi o fator que efetivamente influenciou na redução do tempo total de análise.

O uso de um espectrofotômetro de microplacas UV/Visible permite a determinação da absorvância de 96 amostras simultaneamente, garantindo maior produtividade no laboratório. Por outro lado, quando um espectrofotômetro convencional é empregado, a cubeta precisa ser lavada entre cada medição, de modo que é necessário um tempo

muito maior para realização da análise. Por isso, a miniaturização torna o método ainda mais acessível e fácil de implementar na rotina, especialmente para farmácias de manipulação e pequenas indústrias fitoterápicas, que são as principais produtoras e fornecedoras de ESFs e outros produtos naturais. Considerando as características dessas empresas, o desenvolvimento de métodos simples para a quantificação de taninos em extratos naturais, que possam ser facilmente aplicados sem a necessidade de operadores altamente qualificados, equipamentos caros ou reagentes é extremamente válido, desejável e importante. Todas essas características reduzem o custo do método, facilitando a adequação para aplicação na análise de rotina de controle de qualidade.

Muitos métodos colorimétricos/espectrofotométricos previamente descritos na literatura científica, envolvendo a reação de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis totais ou taninos totais empregam grandes volumes de reagentes, assim como o método preconizado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). Em relação ao tempo gasto para realização da análise, é difícil estabelecer comparações efetivas com esses métodos, já que o tempo necessário para cada etapa de análise nem sempre é descrito. Entretanto, é possível verificar uma grande diversidade no tempo de reação, o qual varia de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, até 6 horas (GUO *et al.*, 2007; BEKIR *et al.*, 2013; AMRI *et al.*, 2017; SAFFARZADEH-MATIN e KHOSROSHAHI *et al.*, 2017). Como verificado anteriormente na avaliação da robustez do método miniaturizado durante a validação, o tempo de reação é determinante para a precisão dos resultados. Tempos muito longos são prejudiciais e podem resultar em valores de absorvância inferiores aos valores reais.

Além da grande vantagem econômica, o fator ambiental também deve ser considerado. O método miniaturizado consome consideravelmente menos reagentes e eletricidade, produzindo menos resíduos químicos e contribuindo para a química verde, uma preocupação atual em laboratórios analíticos.

II.4.6 Identificação dos ESFs por CCD

A CCD é uma técnica bem estabelecida e amplamente utilizada para identificação de substâncias em matrizes complexas, principalmente em produtos naturais. Entretanto, embora haja diversos estudos sobre a *Punica granatum* L., é escassa a literatura para identificação de ácido elágico e punicalagina em produtos dessa planta por CCD, utilizando padrões dessas substâncias como comparação. Dentre os métodos disponíveis, nenhuma das condições reproduzidas no laboratório permitiram a eluição e a separação desses dois marcadores, simultaneamente (FAKHRI; PETROCZI; NAUGHTON, 2014; FOSS *et al.*, 2014; HANU; HARMANPREET, 2012; HOLETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2002; SANGEETHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

Desse modo, foi necessário desenvolver um método, por meio da otimização de vários parâmetros e condições, os quais foram sendo alterados progressivamente, de acordo com os resultados obtidos em cada teste. Os ajustes foram feitos visando sempre o alcance de uma separação entre as manchas de ácido elágico e punicalagina que fosse suficiente para permitir a identificação da presença dessas duas substâncias nos extratos analisados. Um resumo das principais condições testadas durante a otimização do método por CCD pode ser visto na **Tabela 20**.

Tabela 20 – Resumo das condições testadas durante a otimização do método por cromatografia em camada delgada.

Nº do teste	Volume aplicado	Fase móvel	Tamanho da placa ²	Revelador	Resultados do teste
1	10 µL	Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (55:36:9; v/v/v)	2,5 x 10 (cm)	FeCl ₃ 1% (p/v) em etanol	AE e PN não foram eluídos, ficando retidos no ponto de aplicação.
2	20 µL	Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (45,5:45,5:9,0; v/v/v)			FM ainda fraca para eluir bem os analitos: AE foi arrastado ao até o meio da placa (mancha contínua) e PN apenas iniciou o deslocamento.
3	10 µL e 20 µL	Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (11:78:11; v/v/v)			O aumento da polaridade em relação aos testes 1 e 2 não foi eficaz, apenas aumentando o arraste do AE. A alteração de volume não influenciou o resultado.
4	10 µL	Acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v/v)	2,5 x 15 (cm)	NaNO ₂ 1% (p/v) em metanol	Mesmo com grande aumento da polaridade, a PN ficou retida no ponto de aplicação e o AE com uma mancha ao longo da placa.
5	20 µL	Água:ácido acético (80:20; v/v)			PN foi eluída (2 manchas distintas) e AE foi parcialmente eluído. O revelador NaNO ₂ permitiu melhor visualização e distinção por diferença de cores das manchas de AE (cinza) e PN (amarela).
6	20 µL	Água pH 2,30 ajustado com ácido acético			O discreto aumento do pH piorou significativamente a eluição e a separação dos analitos.
7 ¹	10 µL	Água pH 2,00 ajustado com ácido acético			A realização do teste 5 com ajuste do pH para 2,00 e em placa mais longa melhorou a eluição e a separação dos analitos.

¹Método escolhido para análise.

²Fase estacionária: Sílica Gel 60 F₂₅₄.

AE: ácido elágico. FM: fase móvel. PN: punicalagina.

O grande desafio durante o desenvolvimento foi conseguir a eluição do ácido elágico e da punicalagina com um mesmo método. A alta polaridade dos dois marcadores e o tamanho molecular elevado da punicalagina dificultaram o alcance de condições de eluição ótimas, já que as substâncias ficavam retidas no ponto de aplicação ou formavam uma banda contínua de arraste ao longo da placa de fase normal (Sílica Gel 60 F₂₅₄). Entretanto, a utilização de placa com fase apolar (Sílica Gel 60 RP18 F₂₅₄), também não permitiu a obtenção de bons resultados, mantendo a ausência de eluição dos analitos. Desse modo, manteve-se o uso da fase estacionária polar nos testes.

A otimização da fase móvel, por meio do uso de diferentes misturas de solventes orgânicos, normalmente utilizados para a CCD de taninos, mesmo após grande variação na polaridade e ajuste de pH, não foi suficiente para o alcance dos objetivos esperados. Desse modo, foi necessário o uso de uma fase móvel aquosa e com um pH bastante baixo (2,00), para eluição e separação dos analitos. A otimização do pH foi realizada levando em consideração os valores de pKa do ácido elágico (5,54) e da punicalagina (5,12), para assegurar que estivessem totalmente na forma não ionizada, reduzindo, assim, a afinidade pela fase estacionária polar, promovendo a eluição, e evitando a formação de caudas e/ou manchas duplas de um mesmo analito.

Entretanto, ainda assim, foi obtida uma baixa eluição para o ácido elágico ($R_f = 0,06$), que pode ser explicada por sua elevada polaridade (coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) = 2,32) e pela conformação planar da molécula, o que aumenta a área de interação com o adsorvente. Do mesmo modo, a obtenção de maiores valores de R_f para a punicalagina ($\log P = 3,31$), pode estar relacionada à sua alta massa molecular que leva: (1) a uma redução da polaridade quando comparada ao ácido elágico, devido ao grande número de anéis aromáticos e à ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares; e (2) a um impedimento estérico, dificultando a interação com os sítios ligantes da fase estacionária.

Além disso, a punicalagina consiste em uma mistura dos anômeros α e β , de modo que a diferença na conformação dos dois isômeros pode levar à obtenção de retenções distintas (AQIL *et al.*, 2012; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015). Esse fato pode justificar a formação de duas manchas para o padrão de punicalagina. Provavelmente, a mancha com menor valor de R_f corresponde à forma mais plana da molécula, ao passo que a conformação com maior angulação interage menos com a fase estacionária, sendo eluída até a porção superior da placa. Machado *et al.* (2002) também utilizaram água acidificada como eluente para identificação da punicalagina obtida por isolamento a partir do extrato de *Punica granatum* L., obtendo duas manchas distintas. Outro fator que pode justificar a formação de duas manchas para a punicalagina, é a possível ocorrência de hidrólise ácida dessa substância durante a eluição, devido ao uso de uma fase aquosa com baixo valor de pH, de modo que a mancha com maior R_f pode corresponder a um produto resultante dessa hidrólise.

Desse modo, a melhor condição obtida, que permitiu diferenciar as manchas de ácido elágico e punicalagina, foi a de número 7 na **Tabela 20**. Essa condição foi aplicada na identificação de todos os ESFs e os resultados obtidos com o método desenvolvido, bem como os teores dos marcadores ativos nos ESFs e as cores dos mesmos, podem ser vistos na **Tabela 21**. A comparação das manchas obtidas para os ESFs com as dos padrões de ácido elágico e punicalagina, permitiu verificar uma estreita relação e grande coerência entre: (1) cor do ESF; (2) teor de ácido elágico e de punicalagina calculados no doseamento por CLAE-UV (item II.4.4.3); e (3) posição e cores das manchas observadas na análise por CCD. Em todos os ESFs de coloração amarronzada e baixos teores de ácido elágico, apenas manchas com valores de *Rf* iguais aos da punicalagina foram observadas, não sendo possível identificar o ácido elágico. Já para os ESFs de cor acinzentada (teor de ácido elágico > 45,0%, p/p), houve apenas a mancha correspondente àquela observada para o padrão de ácido elágico.

Além disso, apenas nos ESFs 11 e 19, que possuem teor de punicalagina de 11,25% (p/p) e 19,97% (p/p), respectivamente, foi possível visualizar as duas manchas da punicalagina, indicando que a intensidade das manchas observadas tem uma correlação com a concentração dos marcadores. Provavelmente, a mancha com *Rf* de 0,77 corresponde ao isômero minoritário da punicalagina. As placas cromatográficas obtidas para os padrões de ácido elágico e punicalagina, para os ESFs 1, 2, 14 e 19, podem ser vistas na **Figura 15**.

Tabela 21 – Resultados obtidos na análise por CCD para os ESFs e padrões de ácido elágico e punicalagina. Teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs e cores dos mesmos.

ESFs e Padrões	Cor dos ESFs e Padrões	Teores (% p/p) ⁷		Rfs médios das manchas		Cores das manchas
		AE	PN	AE	PN	
1	Cinza	98,37	-	0,06	-	Cinza
2 ¹	Cinza	46,74	-	0,06	-	Cinza
3 ¹	Cinza	52,93	-	0,06	-	Cinza
4	Creme escuro	60,11	-	0,06	-	Cinza
5	Cinza	44,80	-	0,06	-	Cinza
6 ²	Cinza	66,57	-	0,06	-	Cinza
7 ²	Cinza	45,14	-	0,06	-	Cinza
8 ³	Cinza	48,48	-	0,06	-	Cinza
9 ³	Cinza	49,16	-	0,06	-	Cinza
10	Cinza	44,08	-	0,06	-	Cinza
11	Marrom	4,48	11,25	-	0,32 - 0,77	Amarela
12	Marrom	-	3,17	-	0,32	Amarela
13	Marrom	-	3,47	-	0,32	Amarela
14 ⁴	Marrom	-	3,19	-	0,32	Amarela
15 ⁴	Marrom	-	3,47	-	0,32	Amarela
16	Amarelo	-	4,88	-	0,32	Amarela
17 ⁵	Amarelo	-	4,73	-	0,32	Amarela
18 ⁵	Amarelo	-	3,02	-	0,32	Amarela
19 ⁶	Marrom	3,32	19,97	-	0,32 - 0,77	Amarela
AE	Cinza	97,9	-	0,06	-	Cinza
PN	Amarelo	-	96,3	-	0,32 - 0,77	Amarela

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

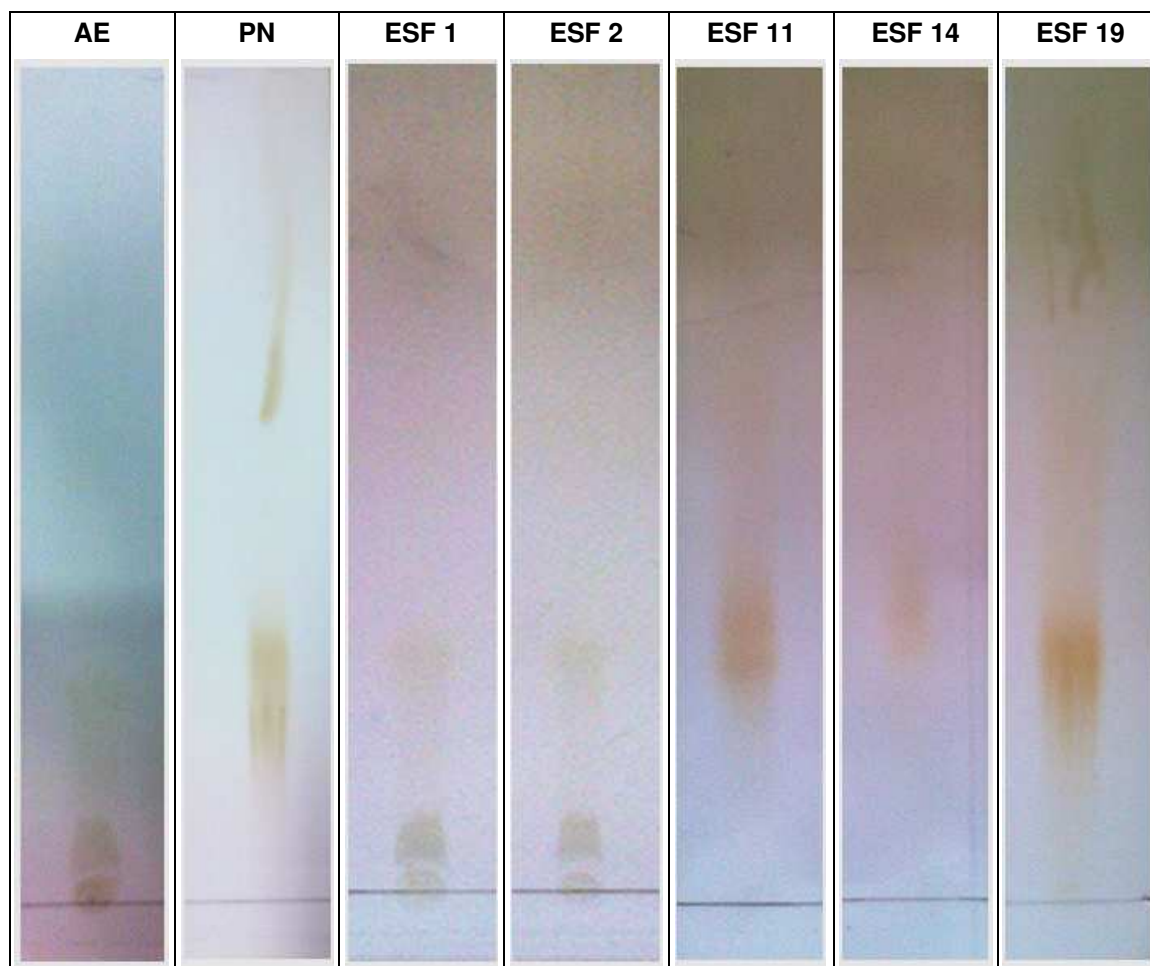
⁵Extratos fabricados pela mesma indústria, mas com excipientes diferentes: extrato 17 com amido e extrato 18 com maltodextrina. O laudo não foi disponibilizado.

⁶Extrato controle.

⁷Teores de AE e PN calculados no ensaio de doseamento por CLAE-UV (item II 4.4.3) para os ESFs.

AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina. Rf: fator de retenção.

Figura 15 – Cromatogramas obtidos com o método de CCD desenvolvido para os padrões de ácido elágico e punicalagina e para os ESFs 1, 2, 11, 14 e 19.



AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

A identificação de taninos característicos da romã, como a punicalagina, é fundamental para o controle de qualidade de fitoterápicos, assegurando que não houve adulteração com adição excessiva de ácido elágico ao ESF ou processo de produção e armazenamento inadequado. Além disso, considerando que a CCD é uma técnica de baixo custo, que permite a identificação da composição dos extratos de forma rápida e simples, o desenvolvimento desse método e a comprovação de sua eficácia na identificação de 18 ESFs comerciais é de extrema importância para o controle de qualidade dos produtos fornecidos para a população. Ele pode ser facilmente aplicado por farmácias magistrais e indústrias de pequeno porte que desejam uma análise rápida ou que não dispõem de equipamentos para doseamento, como cromatógrafos ou espectrofotômetros.

CAPÍTULO II

A grande diferença observada entre os cromatogramas obtidos para os ESFs comerciais pode ser um indício da obtenção de respostas biológicas também diferentes, indicando a necessidade de maior atenção das agências regulatórias para a padronização e controle de adulteração de fitoterápicos, de modo a valorizar a composição natural dos produtos.

II.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nessa primeira etapa, foi possível obter um número de ESFs comerciais de origens distintas bastante satisfatório (18 ESFs), permitindo a análise da variabilidade presente no mercado. Além disso, o ESF controle utilizado como padrão de comparação em todos os demais ensaios realizados, incluindo o doseamento de ácido elágico e punicalagina (item II.4.4), o doseamento de taninos totais (item II.4.5), a identificação por CCD (item II.4.6) e a avaliação de atividades biológicas atribuídas a esses extratos (CAPÍTULO III), foi produzido com sucesso, concluindo assim essa primeira fase fundamental para a execução de todo o trabalho.

A avaliação cromatográfica por CCD e por CLAE-UV permitiu a identificação e a quantificação de ácido elágico e punicalagina nos ESFs, de modo que os resultados foram coerentes entre si. Extratos que apresentaram apenas a mancha de ácido elágico na CCD foram aqueles com teores elevados de ácido elágico (> 40%, p/p), ao passo que ESFs que tiveram apenas a mancha característica da punicalagina, apresentaram 4% (p/p) ou mais desse marcador. Além disso, os extratos com manchas mais intensas da punicalagina foram os que demonstraram maior teor (ESF 11 e ESF controle).

Esses resultados também foram coerentes com aqueles obtidos na quantificação de taninos totais utilizando o método espectrofotométrico miniaturizado desenvolvido nesse estudo. Para os ESFs com teores elevados de ácido elágico (> 40%, p/p), foram obtidos valores muito baixos de taninos totais (< LIQ e > LID ou até mesmo < LID). Já para aqueles ESFs em que foi possível quantificar a punicalagina por CLAE-UV, também foram obtidos valores de taninos totais acima do LIQ.

A coerência e concordância dos resultados obtidos pelos três métodos é um indicativo tanto da qualidade dos métodos desenvolvidos, quanto dos resultados emitidos. A punicalagina é o marcador ativo mais indicado para o controle de qualidade de ESFs e para a verificação da autenticidade, conforme destacado Martin *et al.* (2009), já que é uma substância quase exclusiva da *Punica granatum* L., não sendo encontrada em outros frutos comuns, e está presente em altas concentrações. Entretanto, em

nenhum dos laudos analisados a punicalagina foi utilizada como marcador, sendo prevalente a emissão do teor de ácido elágico, uma substância extraída de diversos frutos e demais partes de outras espécies vegetais. Madrigal-Carballo *et al.* (2009) e Martin *et al.* (2009) também analisaram produtos derivados da *Punica granatum* L. e obtiveram resultados semelhantes, com a obtenção de teores nulos ou baixíssimos de punicalagina e elevados de ácido elágico.

CAPÍTULO III

CONTROLE DE QUALIDADE BIOLÓGICO DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE *Punica granatum* L.

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido.”

(Blaise Pascal)

III.1 INTRODUÇÃO

A definição das atividades biológicas estudadas nesse trabalho foi realizada a partir de amplo levantamento bibliográfico, objetivando-se selecionar atividades bem estabelecidas, com uso tradicional difundido e/ou grande número de estudos nos últimos anos. Em geral, essas atividades, mesmo nos artigos mais recentes, estão associadas ao uso tópico de extratos fluidos, tinturas, cremes, pomadas, shampoos, géis, decoctos, infusões, dentre outras formas contendo a *Punica granatum* L.. Ainda são escassos estudos com foco na administração via oral de ESFs, de modo que a avaliação e/ou confirmação da existência de atividades biológicas para esses produtos é de interesse científico, podendo servir como ponto de partida para estudos complementares e mais aprofundados.

As indicações para o uso dos ESFs via oral que são encontradas nos sites, em farmácias de manipulação ou em lojas de produtos naturais, em sua maioria com apelo estético, também foram levadas em consideração para a escolha de quais atividades avaliar nesse estudo. Além disso, buscou-se avaliar o impacto de ESFs com diferentes composições sobre parâmetros fisiológicos do organismo.

A existência de correlação entre as concentrações dos marcadores ativos em ESFs comerciais e a intensidade da resposta biológica é outro ponto pouco relatado na literatura. Como a concentração desses marcadores é bastante variável, pode-se supor que a resposta também seja diferente, sendo possível estimar quais substâncias presentes nos ESFs estão mais relacionadas a uma determinada atividade biológica. Além disso, é possível e bastante relevante avaliar se há a existência de sinergismo entre os componentes dos ESFs, potencializando as atividades biológicas.

Desse modo, optou-se por avaliar as atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória dos padrões de ácido elágico e punicalagina, dos ESFs comerciais e do ESF controle, além do impacto sobre a homeostasia. Nos estudos em que houve viabilidade prática (quantidade de material, tempo, células, animais, etc), todos os ESFs adquiridos foram avaliados. Para os demais testes, foi selecionado um ESF

CAPÍTULO III

comercial para cada faixa de concentração de ácido elágico (90%, 40% e 15%, p/p) e para teor em taninos totais declarados no laudo, além do ESF controle.

III.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.2.1 Atividade antibacteriana da *Punica granatum* L.

É comum o relato do uso de produtos naturais como adjuvantes no combate a infecções microbianas, havendo inúmeros registros de substâncias extraídas ou derivadas de plantas com ação antibacteriana. O aumento no número de estudos farmacológicos, apontando a presença de agentes antimicrobianos em plantas e fitoterápicos, a maior consciência da população sobre o risco do uso excessivo e indiscriminado de antibióticos tradicionais e o crescimento do índice de microrganismos resistentes, intensificou a atenção e aceitação ao uso de plantas medicinais no tratamento e na prevenção de infecções (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; DEY *et al.*, 2012; JANANI; ESTHERLYDIA, 2013; KHAN; HANEE, 2011).

O uso da *Punica granatum* L. como antimicrobiano remete aos tempos bíblicos, de modo que os egípcios a utilizavam contra diversas infecções. Ao longo dos anos, pesquisas envolvendo a avaliação da atividade antibacteriana da *Punica granatum* L. tornaram-se mais comuns, havendo, hoje, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (CHOI *et al.*, 2011; DEY *et al.*, 2012; HOWELL; D'SOUZA, 2013; KHAN; HANEE, 2011).

Foram identificados efeitos positivos sobre bactérias entéricas patogênicas, causadoras de infecções alimentares, como a *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp e *Listeria monocytogenes*. Em testes para conservação de alimentos, a *Punica granatum* L. foi eficaz, inibindo crescimento de *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*. Em contrapartida, as urolitinas, metabólitos do ácido elágico, favoreceram o crescimento de bactérias probióticas intestinais, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (HOWELL; D'SOUZA, 2013; JANANI; ESTHERLYDIA, 2013; MARCHI *et al.*, 2015).

No tratamento de feridas, o uso de pomadas e géis contendo extratos de *Punica granatum* L. aumentou a taxa de cicatrização, prevenindo infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Typhimurium e *Streptococcus pneumoniae*, e

promovendo o aumento da produção de colágeno e proteínas no local da ferida (HOWELL; D'SOUZA, 2013; JANANI; ESTHERLYDIA, 2013; MARCHI *et al.*, 2015).

Diversos estudos *in vitro* indicaram a eficácia da *Punica granatum* L. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, as quais podem causar infecções fatais em pessoas com o sistema imunológico enfraquecido. Outras bactérias difíceis de tratar são a *Acinetobacter baumannii* e a *Helicobacter pylori*. Foi verificado que extratos de *Punica granatum* L. inibiram significativamente o crescimento da *Helicobacter pylori* e atuaram com sucesso como agente modificador de resistência do antibiótico novobiocina, utilizado no controle de infecções hospitalares por *Acinetobacter baumannii*. O aumento da sensibilidade a antibióticos, verificado para produtos derivados da *Punica granatum* L., está relacionado à existência de sinergismo com fármacos convencionais, sendo esse efeito decorrente da inibição da bomba de efluxo e/ou do aumento do influxo do antibiótico (HAJIMAHMOODI *et al.*, 2011; HOWELL; D'SOUZA, 2013; PHATTHALUNG; CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012).

Esse potencial antimicrobiano é atribuído, principalmente, aos taninos hidrolisáveis, como a punicalina e a punicalagina. Entretanto, outros componentes, como ácidos fenólicos (ácido elágico e ácido gálico), antocianinas (pelargonidina-3-galactose e cianidina-3-glicose), flavonoides (quercetina e miricetina) e metabólitos (toxinas metabólicas), também podem contribuir sinergicamente para a atividade (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; DEY *et al.*, 2012; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; HOWELL; D'SOUZA, 2013; KHAN; HANEE, 2011; MALVIYA *et al.*, 2014). Desse modo, diferenças na atividade apresentada por extratos do pericarpo da *Punica granatum* L. podem ser parcialmente atribuídas a variações no conteúdo fenólico, em decorrência da origem do fruto e de diferenças no processo de produção e armazenamento dos extratos, das sensibilidade das cepas e dos procedimentos adotados nos testes (AL-ZORECK, 2009; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; HOWELL; D'SOUZA, 2013).

Entretanto, como a composição do pericarpo do fruto da *Punica granatum* L. é extremamente complexa, é difícil a elucidação completa e exata dos mecanismos envolvidos na ação antibacteriana. Essa complexidade leva à observação de boa

resposta para um amplo espectro de bactérias (FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012). A atribuição aos taninos da maior contribuição para a atividade, está embasada em sua estrutura molecular, que os tornam capazes de precipitar proteínas intensamente em reações com os grupos tióis (-SH) e em outras interações inespecíficas. Essa característica resulta na capacidade de: (1) lesar tanto a parede quanto a membrana celular dos microrganismos, favorecendo a lise e morte celular; (2) suprimir enzimas bacterianas, como as glicosiltransferases; (3) interferir na secreção de proteínas, sinalização e agregação bacteriana. Já os flavonoides agem formando complexos com proteínas extracelulares e solúveis nas paredes bacterianas (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; AL-ZORECK, 2009; DEY *et al.*, 2012; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; JURENKA, 2008; MENA *et al.*, 2012).

Diversas técnicas e métodos podem ser aplicados na mensuração *in vitro* da atividade de antimicrobianos contra microrganismos. Como o princípio de cada método é particular, os resultados obtidos podem ser variáveis, sendo influenciados não apenas pelo método escolhido, mas também pelas cepas e materiais utilizados, e pelo modo de preparo das amostras a serem testadas. Alguns métodos foram padronizados por farmacopeias e por órgãos como o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o Comitê Europeu de Análise de Susceptibilidade aos Antimicrobianos – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; MAGALDI *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Os métodos para ensaios microbiológicos mais citados na literatura, atualmente, são ensaios de difusão e diluição. Nos ensaios de diluição, as substâncias a serem testadas são adicionadas ao meio de cultura líquido (caldo), previamente inoculado com o microrganismo teste. A determinação do resultado pode ser por leitura visual direta ou por avaliação da turbidez com espectrofotômetros. Podem ser classificados como métodos de macro ou microdiluição, dependendo dos volumes de meio e amostra utilizados. A microdiluição em caldo vem sendo amplamente aplicada na determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), em decorrência da simplicidade de uso, economia de reagentes e menor gasto de tempo para a análise, por utilizar microplacas de 96 poços. Já nos ensaios de difusão são utilizados meios

de cultura sólidos e inoculados, sendo determinado o diâmetro do halo de inibição a partir do ponto de aplicação da amostra, que pode ser feita por diferentes modos: discos de papel, cilindros de porcelana ou aço inoxidável, ou orifícios perfurados no meio de cultura (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; FARMACOPEIA, 2010; MAGALDI *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Entretanto, quando para análise de produtos vegetais, algumas modificações dos protocolos padronizados são frequentemente necessárias, sendo fundamental ter cuidado para não serem feitas mudanças drásticas, implicando na perda da qualidade e confiabilidade dos resultados. Os modos de preparo, diluição e aplicação das amostras aos meios, modos de leitura dos resultados, concentração dos meios de cultura e dos inóculos, são os principais fatores que podem sofrer modificações, merecendo grande atenção durante a otimização e padronização do método (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2009).

III.2.2 Atividade antioxidante da *Punica granatum* L.

Várias atividades biológicas associadas ao uso tópico ou oral da *Punica granatum* L., tais como ação anti-inflamatória, antidiabética, antiobesidade, antitumoral, proteção cardiovascular, dentre outras, estão relacionadas ao potencial antioxidante dessa planta, especialmente do fruto e de suas frações (LUCCI *et al.*, 2015; ORAK; YAGAR; ISBILIR, 2012). Aproximadamente 50% do peso total do fruto corresponde ao pericarpo, o qual contém a maior quantidade de compostos fenólicos bioativos, como elagitaninos, galotaninos, ácido elágico e flavonoides, como as antocianinas (SEERAM *et al.*, 2008; SREEKUMAR *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo presente em doenças crônicas como diabetes, artrite reumatoide e aterosclerose, induz danos a constituintes do plasma sanguíneo e às células, lesando diversos tecidos. Embora o sangue humano contenha naturalmente fatores antioxidantes preventivos de danos teciduais, o uso de antioxidantes exógenos pode ser benéfico para a prevenção e redução de complicações associadas a doenças crônicas (MEDINA *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2014). Os elagitaninos hidrolizáveis são um dos principais antioxidantes capazes de atuar no controle do estresse oxidativo. Eles auxiliam na eliminação de radicais livres, reduzindo a peroxidação

lipídica nos tecidos hepático, cardíaco e renal, e estimulam a capacidade de eliminação dos radicais livres do oxigênio molecular e do peróxido de hidrogênio (LUCCI *et al.*, 2015; ORAK; YAGAR; ISBILIR, 2012; SREEKUMAR *et al.*, 2014).

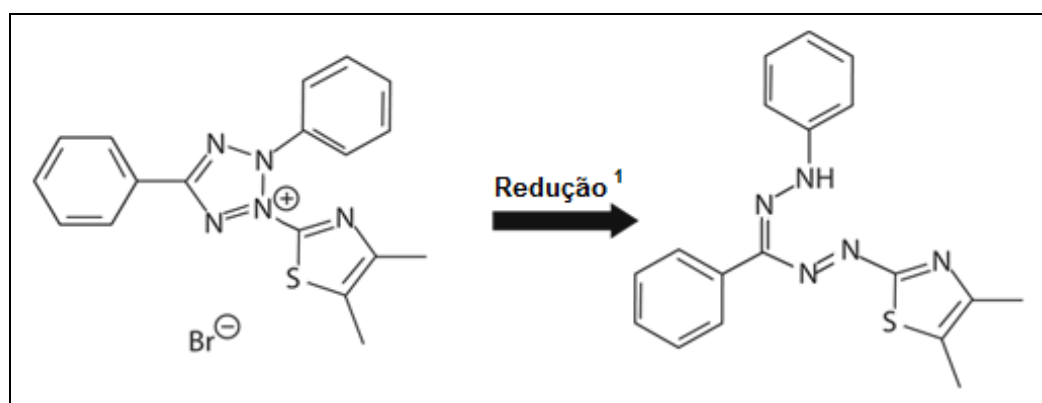
Essa atividade foi verificada em estudos *in vitro* e *in vivo* para produtos derivados de *Punica granatum* L., como suco da polpa das sementes e extratos do pericarpo, sendo que o segundo apresentou maior atividade, o que demonstra a existência de correlação entre a concentração de polifenóis e a atividade antioxidante do produto. Comparado com outras fontes, como o vinho tinto e o chá verde, e com o suco de outras frutas, como uvas, açaí, maçã, amora, framboesa, mirtilo, cereja, dentre outras “berries”, o suco da polpa das sementes de *Punica granatum* L. possui um teor de antioxidantes muito superior (LUCCI *et al.*, 2015; MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2009; ORAK; YAGAR; ISBILIR, 2012; SEERAM *et al.*, 2008; SREEKUMAR *et al.*, 2014).

O ácido elágico e a punicalagina, assim como o ácido ascórbico (AC), possuem ligações duplas com deficiência de elétrons altamente reativas aos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio *singlet* (1O_2), hidroxila (OH^{\cdot}) e hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), sendo capazes de eliminar esses radicais, minimizando a peroxidação lipídica (MEDINA *et al.*, 2007; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015; WILLIAMS *et al.*, 2014). Devido à ação sinérgica entre esses e outros constituintes da *Punica granatum* L., foi verificado em alguns estudos que o potencial antioxidante em produtos naturais, onde há associação de diversos taninos, é maior do que em concentrações equivalentes de apenas um dos constituintes isolados (VORA; LONDHE; PANDITA, 2015).

Existem na literatura diversas técnicas para a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de extratos e demais produtos naturais em solução. Entretanto, métodos para quantificação do *status* antioxidante do plasma sanguíneo humano são escassos (ALVES *et al.*, 2010; MEDINA *et al.*, 2007). Técnicas eletroquímicas permitem a avaliação da atividade antioxidante tanto de ativos isolados, quando em matrizes complexas, como fitoterápicos e plasma humano (ALVES *et al.*, 2010). Sais tetrazólicos, como o brometo de azul de tiazoliltetrazólio (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico – MTT) são reduzidos por diversas substâncias. O MTT dá origem ao formazam por meio de reações de redução: (1) puramente químicas; (2) metabólicas mediadas por enzimas do retículo endoplasmático de mitocôndrias de células viáveis;

e (3) diretas por proteínas plasmáticas e demais substâncias antioxidantes presentes no plasma humano, como ascorbato, urato e α -tocoferol (**Figura 16**) (ALTMAN, 1976; CARMICHAEL *et al.*, 1987; MEDINA *et al.*, 2007).

Figura 16 – Conversão do MTT em formazan.



¹Redução promovida por diferentes mecanismos e agentes redutores.

MTT: brometo de azul de tiazoliltetrazólio (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólio).

Métodos para avaliação da atividade antioxidante utilizando o MTT, embora escassos, foram utilizados com sucesso por Duarte (2012) e Medina *et al.* (2007) na avaliação do *status* antioxidante do plasma humano. A vantagem do uso dessa técnica (redução do MTT) está na simplicidade e na possibilidade da aplicação na avaliação tanto de produtos fitoterápicos em solução, quanto de amostras de plasma de voluntários ou pacientes que utilizaram esses produtos via oral (ALVES *et al.*, 2010; ALTMAN, 1976; DUARTE, 2012; MEDINA *et al.*, 2007).

III.2.3 Atividade anti-inflamatória da *Punica granatum* L.

A inflamação é a primeira reação de defesa fisiológica do corpo humano, para proteção contra ferimentos e injúrias causadas pelos mais diversos estímulos inflamatórios. Esse sistema de defesa rápida (inflamação aguda) é capaz de destruir microrganismos infecciosos e eliminar substâncias e compostos irritantes para manutenção das funções fisiológicas em níveis normais. Entretanto, a permanência da inflamação descontrolada e mantida por períodos prolongados pode levar a processos crônicos, como a asma e a artrite reumatoide (AMDEKAR *et al.*, 2012; BEKIR *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010; MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010).

Desde a antiguidade, várias culturas em todo o mundo utilizam plantas e seus derivados no tratamento de distúrbios inflamatórios e de doenças relacionadas. Produtos naturais são fontes comuns de substâncias eficazes na inibição da função e infiltração celular, de modo que vários metabólitos secundários são capazes de modular diretamente a inflamação, alterando a produção e a atividade de mensageiros, e a expressão de fatores de transcrição e de moléculas pró-inflamatórias. Essas propriedades, muitas vezes, permitem a obtenção de alívio dos sintomas semelhante ao obtido com medicamentos alopáticos (FAVARIN *et al.*, 2013; MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010).

As cascas da *Punica granatum* L. são consideradas, na medicina tradicional chinesa e na cultura egípcia, um poderoso agente adstringente e anti-inflamatório, e são aplicadas no tratamento de hemorragia traumática, úlceras, infecções e distúrbios do trato gastrointestinal. Na Índia, Tunísia e Guatemala, o decocto de cascas do fruto secas é empregada como cura para aftas e úlceras (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; MO *et al.*, 2013; OUACHRIF *et al.*, 2012). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* confirmam a existência de atividade anti-inflamatória da *Punica granatum* L. e de seus derivados para tratamentos tópicos e orais, contra feridas, aftas, úlceras, doenças pulmonares, colite, osteoartrite, dentre outras (BACHOUAL *et al.*, 2011; BEKIR *et al.*, 2013; FAVARIN *et al.*, 2013; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; LEE *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013; MOGHADDAM *et al.*, 2014; OUACHRIF *et al.*, 2012; RAHIMI; ARASTOO; OSTAD, 2012). No Anexo I da resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010 da ANVISA, que contém a relação de drogas vegetais regulamentadas pela ANVISA no Brasil, e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 1ª edição, que trás formulações reconhecidamente farmacopeicas, há indicação do uso tópico do pericarpo da *Punica granatum* L. como decocto, infusão ou tintura em bochechos e gargarejos para tratamento de inflamações e infecções da mucosa da boca e faringe como anti-inflamatório e antisséptico.

As propriedades analgésicas e anti-inflamatórias atribuídas à essa planta medicinal estão relacionadas ao conteúdo de polifenóis totais e, mais especificamente a alguns de seus constituintes, como ácido elágico, punicalagina, punicalina, estrictinina A e granatina B (BEKIR *et al.*, 2013; FAVARIN *et al.*, 2013; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR,

2012). Entretanto, ainda há controvérsias em relação aos constituintes com maior influência sobre os efeitos observados, havendo um consenso de que há sinergismo, o qual leva a obtenção de melhores resultados gerais com os extratos do que com os ativos isolados (LEE *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013; MOGHADDAM *et al.*, 2014; MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010; OUACHRIF *et al.*, 2012).

Os mecanismos de ação da *Punica granatum* L. na analgesia e na inflamação ainda não estão completamente esclarecidos, havendo apenas hipóteses. A dificuldade no estabelecimento de conclusões sólidas sobre os mecanismos provavelmente está relacionada à complexidade fitoquímica, podendo ter envolvimento de diversos modos de ação. Foi verificado em diversos estudos que a atividade anti-inflamatória de extratos e componentes da *Punica granatum* L. provavelmente é consequência da capacidade de inibir a infiltração de leucócitos, bloquear as citocinas pró-inflamatórias, e reduzir a produção de óxido nítrico e prostaglandinas. Além disso, eles podem promover a inibição das enzimas COX e lipo-oxigenases (seletivo para COX-2). O efeito analgésico é periférico, não atuando pela via central e estando ligado aos efeitos anti-inflamatórios (FAVARIN *et al.*, 2013; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; JURENKA, 2008; LANDETE, 2011; LANSKY; NEWMAN, 2007; LEE *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013; PANICHAYUPAKARANANT; TEWTRAKUL; YUENYONGSAWAD, 2010; RAHIMI; ARASTOO; OSTAD, 2012).

Existem diversos métodos para medida e avaliação da inflamação *in vivo*, de modo que cada um envolve uma limitação e/ou restrição de uso, sendo aplicados para situações específicas. Alguns exemplos são: (1) medida do aumento da permeabilidade vascular com o corante azul de Evans; (2) contagem de leucócitos e/ou determinação da quantidade de prostaglandinas no exsudato recolhido da cavidade pleural, após indução da inflamação; e (3) mensuração de edema por medida do volume da pata traseira de camundongos, também após indução por algum estímulo, como a carragenina (FEREIDONI *et al.*, 2000).

As carrageninas, cujo nome é derivado da palavra irlandesa “*carraigín*” (musgo irlandês), pertencem a um grupo complexo de polissacarídeos lineares sulfatados, extraídos de algas marinhas vermelhas (rodófitas), capazes de formar géis

termorreversíveis ou soluções altamente viscosas, sendo amplamente utilizados como agentes gelificantes, estabilizantes e emulsionantes em alimentos e produtos farmacêuticos e cosméticos. Elas são classificadas como kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ), de acordo com seu padrão de substituição de sulfato e conteúdo de 3,6-anidrogactose. A carragenina lambda não se gelifica fortemente à temperatura ambiente, sendo a forma utilizada para indução da resposta inflamatória por injeção em animais (MORRIS, 2003; WEBBER *et al.*, 2012).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é clássico, amplamente utilizado e adequado para avaliação *in vivo* da inflamação, pela formação de edema e hiperalgesia, sendo frequentemente utilizado em estudos com anti-inflamatórios sintéticos e para avaliação do efeito anti-edematoso de produtos naturais (AMDEKAR *et al.*, 2012; GUAY *et al.*, 2004; MO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011). A inflamação induzida pela carragenina foi amplamente estudada por diversos pesquisadores, e é aguda, não imune e altamente reprodutível. Os sinais de inflamação (edema, hiperalgesia e eritema) desenvolvem-se imediatamente após a injeção subcutânea, em decorrência da liberação de células inflamatórias e de diferentes mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios, como prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, óxido nítrico, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β e IL-6), bradicinina, histamina, taquicininas, íons superóxido, dentre outros (AMDEKAR *et al.*, 2012; MO *et al.*, 2013; MORRIS, 2003; SILVA *et al.*, 2011; WEBBER *et al.*, 2012).

A inflamação aguda é bifásica, sendo que a primeira fase caracteriza o estágio exsudativo da inflamação, tendo início imediatamente após o estímulo inflamatório, com a liberação de histamina, serotonina e cininas, e estendendo-se por até 2,5 horas. Após esse período, inicia-se a fase tardia, a qual está associada a: (1) liberação de prostaglandinas, principal responsável pela inflamação aguda; (2) edema com volume máximo em torno de 4 h; e (3) aumento do número de células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) no local da lesão. Essa segunda fase é sensível tanto a anti-inflamatórios esteroides, quanto não esteroidais (AMDEKAR *et al.*, 2012; GUAY *et al.*, 2004; MO *et al.*, 2013; MORRIS, 2003; SILVA *et al.*, 2011).

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1 Materiais

III.3.1.1 Substâncias químicas de referência, ESFs e medicamentos

Foram utilizadas as seguintes substâncias químicas de referência, amostras e excipientes:

- a) ácido ascórbico, 99,9% (Merck Brasil Ltda);
- b) ácido elágico, 97,9% (Chromadex™);
- c) brometo de azul de tiazoliltetrazólio (3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico - MTT), 98,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- d) carragenina λ tipo IV, 98,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- e) CETAMIN®, cloridrato de cetamina 10% (Syntec);
- f) discos para teste de sensibilidade bacteriana de penicilina G 10 UI (DME Ltda);
- g) ESF controle (19);
- h) ESFs comerciais (1 a 18);
- i) fosfato de dexametasona, 99,9% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- j) Garamicina®, solução injetável de gentamicina 40 mg/mL (Schering-Plough);
- k) KENSOL®, cloridrato de xilazina 2% (König Brasil S.A.);
- l) penicilina G Potássica (Prodotti Laboratório Farmacêutico);
- m) punicalagina, 96,3% (Chromadex™).

III.3.1.2 Cepas de bactérias

Foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias:

- a) *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212);
- b) *Escherichia coli* (ATCC® 35218);
- c) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 13883);
- d) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853);
- e) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213);
- f) *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615).

III.3.1.3 Equipamentos e instrumentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos e instrumentos:

- a) agitador tipo vórtex MS1, IKA;
- b) balança analítica AUW220D, Shimadzu;
- c) banho-maria TecVap TE-0194, TECNAL;
- d) centrífuga MR 23i, JOUAN;
- e) coagulômetro BFTII, Dade Behring;
- f) estufa de cultura 002CB, FANEM LTDA®;
- g) incubadora de CO₂ SCO2W, SHEL LAB®;
- h) leitor de microplacas espectrofotométrico VersaMax™, Molecular Devices;
- i) pletismômetro 7140, Ugo Basile.

III.3.1.4 Consumíveis e vidrarias

Foram utilizados os seguintes consumíveis e vidrarias:

- a) alça de *Drigalski*;
- b) cubetas com imã para uso em coagulômetros;
- c) microplacas de 96 poços com fundo plano;
- d) pipetas graduadas estéreis;
- e) placas de Petri estéreis (90x15 mm);
- f) tubos para coleta de plasma de 5 mL contendo citrato de sódio tamponado 0,105 mol/L (3,2%, p/v).

III.3.1.5 Reagentes e meios de cultura

Foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura:

- a) carboximetilcelulose, 98,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- b) dimetilsulfóxido (DMSO), 97,0% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda);
- c) kit de reagente TP CLOT (BIOS Diagnóstica Ltda);
- d) kit de reagente TTPA CLOT (BIOS Diagnóstica Ltda);
- e) meio de cultura Brain Heart infusion (OXOID Ltda);

- f) meio de cultura Mueller-Hinton Agar (HIMEDIA®);
- g) meio de cultura Mueller-Hinton Broth (Fluka®);
- h) meio de cultura Tryptic Soy Broth – Bacto™ (BD Ltda);
- i) solução salina fisiológica (cloreto de sódio 0,9%, p/v) (Equiplax Ltda);
- j) tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* – PBS) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

III.3.2 Métodos

Todos os ensaios de controle de qualidade biológico, realizados para avaliação do impacto da composição dos ESFs sobre atividades biológicas, foram realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com parceria entre o laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos e os laboratórios de Microbiologia Clínica (avaliação da atividade antibacteriana), de Hematologia Clínica (avaliação da atividade antioxidante e do impacto sobre a hemostasia) e de Farmacologia (avaliação da atividade anti-inflamatória).

III.3.2.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada com base nos métodos padronizados pelo CLSI e pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição. As condições padronizadas pelo CLSI para preparo e controle da qualidade de soluções, cepas e meios de cultura e realização de experimentos, seguindo as técnicas de microdiluição em caldo e de difusão em ágar que foram utilizadas no presente trabalho, estão descritas nos guias: Padrões de Desempenho para Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana – *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (M100-S25), 2015; Padrões de Desempenho para Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana por Disco – *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* (M02-A11), 2012; Métodos de Diluição Antimicrobiana para Testes de Suscetibilidade para Bactérias Que Crescem Aeróbicamente – *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (M07-A9); e Método de Referência para a Diluição de Caldos para Teste de Suscetibilidade

Antifúngica de Leveduras – *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* (M27-A2).

Algumas condições, como meio de cultura, tempos pré-incubação, diluentes e modo de aplicação das soluções teste no ágar, foram otimizadas devido às características particulares dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina, estando sempre dentro dos limites preconizados pelos guias. Todas as modificações foram validadas quanto a repetibilidade e reprodutibilidade. Em todos os ensaios realizados, foram utilizados controles positivos (penicilina G para cepas Gram-positivas e gentamicina para cepas Gram-negativas), controles negativos (diluentes das soluções) e controles de esterilidade (branco contendo apenas meio de cultura). Todas as etapas do método foram realizadas ao abrigo da luz para evitar foto-oxidação das substâncias presentes nos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina.

Inicialmente, foi realizado um teste de triagem para avaliar a suscetibilidade de cepas bacterianas frente às amostras testadas (ESFs 1 a 18, ESF controle e padrões de ácido elágico e punicalagina). Essa triagem foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando meio Mueller-Hinton, soluções a 600 µg/mL e bactérias de interesse clínico, tendo sido selecionadas três cepas Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC® 35218); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 13883); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), e três Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213); *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615). Uma alíquota de 100 µL de uma suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) foi adicionada aos poços de microplacas contendo 100 µL das soluções teste e a incubação foi realizada em estufa a 36 ± 1 °C por 24 horas. As concentrações das soluções dos antibióticos utilizadas como controle positivo corresponderam a 5 vezes os valores de suas CIMs determinados no laboratório para cada cepa bacteriana, antes do início dos testes.

As cepas que foram sensíveis a pelo menos uma das amostras testadas, ou seja, aquelas em que houve ausência de crescimento visual (turbidez do meio), foram selecionadas para determinação da CIM, seguindo o mesmo procedimento da triagem, porém utilizando diluições seriadas para obtenção das concentrações de 600, 300, 150 e 75 µg/mL. Ao final de todos os testes, foi aplicado o método de coloração

de Gram para análise da morfologia das cepas, de modo a assegurar que os resultados obtidos foram válidos e que não ocorreram contaminações durante o processo. A menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano, ou seja, que levou a obtenção de ausência de turvação do meio, foi considerada como CIM.

Todas as concentrações testadas no ensaio anterior com valores iguais ou superiores à CIM foram ensaiadas para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM): menor concentração da substância que inibe pelo menos 99,9% da viabilidade celular. Para isso, os meios dos poços em que foram adicionadas soluções dos ESFs e dos padrões para os quais foi definida a CIM, foram semeados quantitativamente em ágar Mueller-Hinton (cepas não fastidiosas) ou ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% (v/v) de sangue de equino (cepas fastidiosas). Após incubação nas mesmas condições do ensaio anterior, a CBM foi determinada, calculando a diferença percentual entre o crescimento bacteriano nas regiões em que foram semeados os meios e no controle negativo, por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) (%UFC/mL).

Almejando resultados quantitativos para comparação da intensidade de inibição do crescimento bacteriano pelos ESFs, foi realizado o ensaio microbiológico por difusão em ágar com poços para as três cepas Gram-positivas. O método consistiu na perfuração do ágar, utilizando moldes de aço inoxidável, e preenchimento completo dos poços com as soluções teste (100 µL), as quais foram preparadas na concentração de 60 mg/mL para que, após diluição com o meio, fosse obtida a mesma concentração utilizada na triagem (600 µg/mL). Foi utilizado ágar Mueller-Hinton e, após adição das soluções aos poços e repouso por 1,5 horas, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 36 ± 1 °C por 24 horas. Findado esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição e os resultados obtidos foram comparados àqueles do ensaio para determinação da CIM.

III.3.2.2 Avaliação da atividade antioxidante dos ESFs

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada por meio do método de redução do MTT, previamente desenvolvido e validado (DUARTE, 2012; MEDINA *et*

al., 2007). O teste foi realizado com todos os ESFs comerciais adquiridos (1 a 18), com o ESF controle (19) e com os padrões de ácido elágico e punicalagina a uma concentração de 1000 µg/mL. O ácido ascórbico foi utilizado, na mesma concentração, como controle positivo e o diluente das soluções (PBS:DMSO 50:50, v/v), como branco (controle negativo). Todas as amostras, incluindo os controles negativo e positivo, foram submetidas simultaneamente ao mesmo procedimento do teste e todas as etapas do método foram realizadas ao abrigo da luz para evitar que interferências externas estimulassem a oxidação das substâncias presentes nos ESFs, reduzindo o potencial antioxidante dos mesmos.

Em tubos de ensaio identificados, contendo 100 µL das soluções dos ESFs, padrões e controles em triplicata, foram adicionados 50 µL de PBS e 12,5 µL de solução de MTT 0,5% em PBS (p/v). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e incubados em banho a 37 °C por 60 minutos; tempo necessário para que a reação de oxi-redução ocorra. Após esse período, 750 µL de solução de isopropanol:ácido clorídrico 0,04 mol/L (90:0,3; v/v) foram adicionados aos tubos, os quais foram agitados em vórtex por 30 segundos, para solubilização dos cristais de formazam e bloqueio da reação. Os tubos foram centrifugados a 1702 g por 10 minutos, para retirada de possíveis partículas e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços. A leitura da absorvância foi realizada em um leitor de microplacas espectrofotométrico a um comprimento de onda de 570 nm. Cada amostra foi testada em triplicata e o ensaio repetido três vezes para avaliação da repetibilidade e da reprodutibilidade do método. Os resultados foram expressos como a média das diferenças entre a absorvância obtida para cada amostra e para o branco e como percentual da capacidade antioxidante em relação ao AC (%AC).

III.3.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs

A avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* foi realizada por meio do ensaio de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (FERREIRA, 1979). O protocolo nº 186/2016, contendo todas as informações do estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (ANEXO A).

Três ESFs comerciais (2, 11 e 14), representando duas faixas de teor de ácido elágico (40% e 15%, p/p) e de taninos totais declarados no laudo, juntamente com o ESF controle (19) e com os padrões de ácido elágico e de punicalagina, foram utilizados no ensaio. Foram preparadas suspensões em carboximetilcelulose (CMC 0,5%, p/v) para administração *per os* de 8 mL/kg, correspondendo a uma dose de 100 mg/kg para os ESFs e 10 mg/kg para os padrões. A suspensão de carragenina (20 µg/µL) foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e 20 µL (400 µg) foram administrados via intraplantar na pata posterior direita dos camundongos. A solução do grupo controle positivo (dexametasona – DXM – 3 mg/kg) foi preparada em cloreto de sódio 0,9% (p/v) para administração *per os* de 8 mL/kg. No grupo controle negativo foram administrados 8 mL/kg de solução de CMC 0,5% (p/v).

Foram utilizados camundongos Swiss com 42 dias (25 a 30 g), machos, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h, em sala com ventilação e temperatura controlada, mantida 27 ± 1 °C (zona de termoneutralidade de roedores). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Considerando que o tratamento foi feito *per os*, a ração foi retirada na noite que antecedeu o experimento, de forma que os animais foram deixados em jejum por 10 h. Todos os procedimentos utilizando animais foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, recomendados pela CEUA/UFMG.

A administração *per os* das soluções/suspensões foi realizada 60 minutos antes da injeção intraplantar do estímulo inflamatório (carragenina). O volume de pata foi medido em pletismômetro no dia anterior ao experimento e três vezes após a injeção do estímulo (tempos 0 h, 2 h, 4 h e 6 h). As leituras foram realizadas em triplicata, sendo o resultado final obtido pela média das duas leituras mais próximas e expresso como a diferença entre o volume inicial e final. Ao término do experimento, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com solução contendo cetamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg e eutanasiados por deslocamento cervical.

O tamanho amostral foi proposto considerando que a variação do volume de pata é a variável dependente com maior instabilidade avaliada nesse estudo. Os cálculos foram realizados tendo como base orientações e procedimentos descritos por

Eckelman *et al.* (2007), Dell, Holleran e Ramakrishnan (2002) e Damy *et al.* (2010). Foram utilizados para o experimento 56 animais, os quais foram divididos em oito subgrupos, cada um com sete animais, que receberam dose única das preparações conforme indicado na **Tabela 22**:

Tabela 22 – Subgrupos e preparações utilizadas no estudo de avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs.

Subgrupo	Substância	Dose
1	CMC 0,5%, p/v	8 mL/kg
2	ESF 2	100 mg/kg (8 mL/kg)
3	ESF 11	100 mg/kg (8 mL/kg)
4	ESF 14	100 mg/kg (8 mL/kg)
5	ESF 19	100 mg/kg (8 mL/kg)
6	AE	10 mg/kg (8 mL/kg)
7	PN	10 mg/kg (8 mL/kg)
8	DXM	3 mg/kg (8 mL/kg)

AE: ácido elágico. CMC: carboximetilcelulose. DXM: dexametasona. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da ANOVA simples, *one-way*, seguida pelo teste Newman-Keuls, que compara todos os grupos experimentais entre si. A ANOVA em duas vias, seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para avaliar os resultados na forma de curso temporal. O programa estatístico Prism 5.0 foi utilizado para tais análises e o nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

III.3.2.4 Avaliação do impacto dos ESFs sobre a hemostasia

A avaliação do impacto sobre a hemostasia *in vitro* foi realizada por meio da determinação automatizada do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e do tempo de protrombina (TP) em plasma humano citratado. O protocolo contendo as informações do estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram submetidos, via Plataforma Brasil, ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG credenciado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS) para apreciação. O estudo somente foi iniciado após avaliação e aprovação pelo COEP (Anexo D), sendo

conduzido de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos das Resolução RE nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram utilizados kits comerciais contendo todos os reagentes necessários para realização dos testes (TP CLOT, 2014; TTPA CLOT, 2014). O ensaio de avaliação do TP foi realizado com solução comercial padronizada contendo extrato de cérebro de coelho, cloreto de cálcio e tampão com conservante (reagente TP). Já no ensaio de determinação do TTPA, foram utilizadas duas soluções comerciais padronizadas: (1) cloreto de cálcio 25 mmol/L com conservantes; e (2) extrato de cérebro de coelho com tampão com conservante.

O teste foi realizado com amostras de um pool de plasma humano (5 fontes distintas) adicionadas de soluções dos ESFs comerciais adquiridos (1 a 18), do ESF controle (19) e do padrão de ácido elágico. A partir das soluções estoque em DMSO, foram preparadas soluções intermediárias em solução salina fisiológica (0,9%, p/v) para que a concentração final em plasma fosse obtida, mantendo constante a razão solução:plasma de 1:100, v/v (1%). Após as diluições, a concentração de DMSO no plasma foi de 0,004% (v/v). A definição da concentração em plasma dos ESFs (40,00 ng/mL) e do padrão de ácido elágico foi feita a partir de relatos na literatura para a $C_{máx}$ obtida após administração de uma dose única de 800 mg de um extrato padronizado com 41,3% (p/p) de punicalagina e 2,7% (p/p) de ácido elágico (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2006; JURENKA, 2008; SEERAM; LEE; HEBER, 2004).

Optou-se por utilizar uma concentração única para todas as amostras e comparar as variações nos TPs e TTPAs com os diferentes teores de ácido elágico nos ESFs. Além disso, foram feitas duas curvas com o padrão de ácido elágico: uma na faixa de concentrações normalmente utilizada para determinações farmacocinéticas (0,50 ng/mL a 80,00 ng/mL), e outra com concentrações extrapoladas para avaliação de impactos após consumo exagerado (800,00 ng/mL a 100000,00 ng/mL). Para o cálculo do percentual de atividade em relação ao plasma normal sem adição de soluções teste (considerado 100% de atividade), foi traçada uma curva utilizando o pool de plasmas normais recém colhidos e diluídos com solução salina fisiológica (0,9%, p/v) nas proporções 1:0, 1:2, 1:3, 1:4, 1:8 e 1:10, v/v (100%, 50%, 33%, 25%,

12,5% e 10% de atividade, respectivamente). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e as respostas obtidas dadas como atividade percentual média em relação ao pool de plasmas.

O procedimento para determinação do TP consistiu em:

- a) adaptação de duas cubetas contendo um imã e do reagente TP nos canais de incubação do coagulômetro BFTII;
- b) adição de 50 μ L de plasma em cada cubeta;
- c) acionamento da função de incubação a 37 °C por 120 segundos;
- d) transferência das cubetas para os canais de teste;
- e) adição de 100 μ L do reagente TP após alerta de autorização automático do equipamento (o cronômetro é disparado imediatamente após a adição);
- f) impressão do resultado de tempo de coagulação dado em segundos.

O procedimento para determinação do TTPA consistiu em:

- a) adaptação de duas cubetas contendo um imã, do reagente TTPA e da solução de cloreto de cálcio nos canais de incubação do coagulômetro BFTII;
- b) adição de 50 μ L de plasma e 50 μ L de reagente TTPA em cada cubeta;
- c) acionamento da função de incubação a 37 °C por 120 segundos;
- d) transferência das cubetas para os canais de teste;
- e) adição de 50 μ L de solução de cloreto de cálcio após alerta de autorização automático do equipamento (o cronômetro é disparado imediatamente após a adição);
- f) impressão do resultado de tempo de coagulação dado em segundos.

III.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs

Embora tenham sido utilizados métodos de microdiluição em caldo e de difusão em ágar padronizados e preconizados por guias mundialmente reconhecidos (CLSI, 2002; FARMACOPEIA, 2010; CLSI, 2012a; CLSI, 2012b; CLSI, 2015), alguns parâmetros foram otimizados dentro dos limites recomendados. Inicialmente, foram avaliados 3 tipos de caldos (Brain Heart infusion, Mueller-Hinton Broth e Tryptic Soy Broth) para o ensaio de microdiluição e 2 tipos de ágar (Brain Heart Agar e Mueller-Hinton Agar) para o ensaio de difusão, sendo todos eles recomendados pelos guias e citados em artigos para testes com extratos de *Punica granatum* L. (AL-ZORECK, 2009; CHOI *et al.*, 2011; HOLETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2003). O meio Mueller-Hinton (caldo e ágar) foi selecionado para realização dos experimentos, por permitir o crescimento adequado de todas as cepas testadas e não levar à turvação do meio na ausência de bactérias e na presença apenas da solução. Essa turvação pode ocorrer em alguns meios, em decorrência da precipitação de proteínas pelos taninos presentes nos ESFs (FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012).

Para assegurar a solubilização completa dos ESFs, as soluções estoque foram preparadas em DMSO e as diluições em PBS e meio de cultura (BRAGA *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2011; DEY *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2000; PANICHAYUPAKARANANT; TEWTRAKUL; YUENYONGSAWAD, 2010). Entretanto, considerando que o DMSO é um solvente tóxico para bactérias (FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012), foi determinada a concentração máxima que não inibiu o crescimento das cepas, utilizando diluições seriadas do solvente em meio Muller-Hinton. Considerando o resultado obtido, o qual indicou 2% (v/v) de DMSO como limite para inibição do crescimento bacteriano, foi padronizado o uso de, no máximo, 1,5% (v/v) desse solvente nas soluções teste.

A definição do melhor modo de aplicação das soluções no ágar foi uma etapa crítica para a medida dos halos de inibição, pois algumas características dos componentes dos ESFs, como polaridade e tamanho molecular elevados, dificultaram a utilização

de algumas técnicas convencionais e amplamente aplicadas na rotina (SILVEIRA *et al.*, 2009). O uso de discos de papel impregnados com as soluções teste não forneceu resultados válidos, pois a presença de diversas substâncias dos ESFs, como punicalagina, ácido elágico e outros taninos, com grande número de hidroxilas e grupos polares, levou a ocorrência de fortes interações com o papel, impedindo a difusão e formação de halos de inibição. Essa retenção das amostras nos discos foi nitidamente percebida pela permanência da cor dos ESFs nos papéis (amarelo, marrom ou cinza), mesmo após 24 h de incubação. Esse efeito também foi observado e descrito por Silveira *et al.* (2009).

Desse modo, a alternativa viável e aplicada com sucesso para realização do ensaio microbiológico por difusão em ágar foi a utilização de poços perfurados com moldes estéreis de aço inoxidável. A otimização do tempo de repouso após adição das soluções aos poços e antes da inversão e incubação das placas em 1,5 horas, foi determinante para permitir a difusão adequada das soluções, levando à obtenção de halos mensuráveis e uniformes (FARMACOPEIA, 2010).

O teste de triagem para avaliação da suscetibilidade de bactérias de interesse clínico frente às amostras testadas (**Tabela 23**) permitiu a identificação de 7 ESFs e de 1 padrão com atividade relevante contra duas cepas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ESFs 11, 17, 19 e padrão de punicalagina) e *Streptococcus pyogenes* (ESFs 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19 e padrão de punicalagina). Em alguns poços do ensaio com *Enterococcus faecalis* foi observado uma discreta turvação, muito inferior àquelas obtidas para as outras duas bactérias Gram-positivas, de modo que essa cepa não foi selecionada para a determinação da CIM.

Devido às características morfológicas e clínicas das bactérias Gram-negativas testadas, as quais possuem maior virulência em decorrência do encapsulamento, além de relatos prévios na literatura para produtos a base de *Punica granatum* L. (HOLETZ *et al.*, 2002; AL-ZORECK, 2009), já era esperado que seriam obtidas melhores respostas para espécies Gram-positivas. De fato, os resultados da triagem confirmaram as expectativas, corroborando os dados literários prévios.

Comparando os resultados da triagem, com os teores de ácido elágico e punicalagina calculados no ensaio de doseamento por CLAE-UV (item II.4.4.3) para os ESFs (Tabela 23), é possível perceber uma íntima correlação entre a concentração dos marcadores ativos nos ESFs e as respostas obtidas para extratos e padrões. O padrão de ácido elágico e todos os ESFs com mais de 40% (p/p) desse marcador não inibiram o crescimento de nenhuma cepa, ao passo que o padrão de punicalagina e os extratos com baixo teor de ácido elágico (< 5%, p/p) e elevada concentração de punicalagina (> 5%, p/p), exceto o ESF 15, tiveram atividade contra pelo menos uma espécie.

Tabela 23 – Resultados obtidos na triagem da atividade antibacteriana dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina pelo método de microdiluição em caldo para as cepas testadas e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs.

ESFs e Padrões	Teores (% p/p) ¹		Cepas					
	AE	PN	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
1-10	> 40,70	- ²	+	+	+	+	+	+
11	4,48	11,25	+	+	+	+ ³	-	-
12	- ²	3,17	+	+	+	+ ³	+	-
13	- ²	3,47	+	+	+	+ ³	+	-
14	- ²	3,19	+	+	+	+ ³	+	-
15	- ²	3,47	+	+	+	+	+	+
16	- ²	4,88	+	+	+	+ ³	+	-
17	- ²	4,73	+	+	+	+ ³	-	-
19	3,32	19,97	+	+	+	+ ³	-	-
AE	97,9	-	+	+	+	+	+	+
PN	-	96,3	+	+	+	+ ³	-	-

(+) Presença de turbidez. (-) Ausência de turbidez.

¹Teores de AE e PN calculados no ensaio de doseamento por CLAE-UV (item II.4.4.3) para os ESFs e pureza dos padrões de AE e PN.

²Valores menores que o limite inferior de quantificação (LIQ) e maiores que o limite inferior de detecção (LID).

³Turvação mínima dos meios (muito discreta).

AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

As CIMs e CBMs de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* obtidas para os ESFs 11, 12, 13, 14, 16, 17 e 19 e para a punicalagina foram coincidentes entre si em todas as amostras (CIM = CBM) e os valores variaram entre 75 e 600 µg/mL (Tabela 24). Corroborando os resultados de correlação entre atividade antibacteriana e teores de punicalagina nos ESFs observados na triagem, as CIMs e CBMs obtidas pelo método de microdiluição em caldo mantiveram uma proporcionalidade com os

teores de punicalagina nos ESFs para as duas cepas utilizadas no teste. Considerando essa relação direta entre teor de punicalagina e resposta, e que 75 µg/mL foi a menor concentração avaliada, há possibilidade de que a CIM e a CBM para o ESF 19 e para a punicalagina sejam inferiores a esse valor, sendo interessante a avaliação posterior com concentrações menores.

Além disso, como os ESFs possuem, provavelmente, composições diferentes, uma vez que foram produzidos por indústrias distintas, pode-se supor que algumas variações entre os resultados obtidos para ESFs com teores de ácido elágico e punicalagina semelhantes, como no caso dos ESFs 16 e 17 para *Staphylococcus aureus* (Tabela 24), podem ser decorrentes da existência de sinergismo com outros componentes do ESF.

Tabela 24 – Resultados obtidos na determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos ESFs e dos padrões de ácido elágico e punicalagina pelo método de microdiluição em caldo e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs.

ESFs e PN ¹	Teores (% p/p) ²		Cepas			
	AE	PN	<i>S. aureus</i>		<i>S. pyogenes</i>	
			CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
11	4,48	11,25	300	300	150	150
12 ³	-. ⁴	3,17	-	-	600	600
13 ³	-. ⁴	3,47	-	-	600	600
14 ³	-. ⁴	3,19	-	-	600	600
16 ³	-. ⁴	4,88	-	-	600	600
17	-. ⁴	4,73	600	600	600	600
19	3,32	19,97	150	150	75	75
PN	-	96,3	75	75	75	75

¹Os demais ESFs e o padrão de AE não foram utilizados para a determinação da CIM e da CBM por não terem inibido o crescimento de nenhuma das cepas utilizadas no teste de triagem.

²Teores de AE e PN calculados no ensaio de doseamento por CLAE-UV (item 4.4.3) para os ESFs e pureza dos padrões de AE e PN.

³ESFs com valores de CIM maiores ou iguais à maior concentração testada apenas para a *S. aureus*.

⁴Valores menores que o limite inferior de quantificação (LIQ) e maiores que o limite inferior de detecção (LID).

AE: ácido elágico. CBM: concentração bactericida mínima. CIM: concentração inibitória mínima. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

No ensaio microbiológico por difusão em ágar, a *Enterococcus faecalis* foi inclusa novamente por tratar-se de uma bactéria Gram-positiva, por ter tido turvação para alguns extratos, na triagem, muito mais discreta do que aquelas observadas para outras cepas em que não houve inibição, e por haver a expectativa de que com a

mudança na técnica utilizada (microdiluição em caldo para difusão em ágar) houvesse uma melhora na sensibilidade do método, permitindo a identificação de halos de inibição também para essa espécie. Isso porque, por ser um meio sólido, em que as substâncias ativas ficam restritas e concentradas em uma região menor e específica (região de difusão), há a possibilidade de uma resposta diferente daquela obtida para o meio líquido (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Nessa etapa do estudo, não foi possível realizar os testes com os padrões de ácido elágico e punicalagina, devido à necessidade do uso de uma massa elevada, de modo que não haveria disponibilidade de padrão suficiente. Esse fato impossibilitou a comparação das respostas de ácido elágico e punicalagina nas duas técnicas utilizadas. Entretanto, para os ESFs foi observado o mesmo perfil de respostas, havendo um elevado índice de ausência de formação de halos de inibição naqueles com teores de ácido elágico maiores que 40%, p/p (1 a 10). Em contrapartida, em apenas 4 ESFs (12 a 15) para *Enterococcus faecalis* não houve formação de halo (**Tabela 25**). Além disso, os maiores diâmetros foram obtidos para os ESFs 11 e 19 nas três cepas analisadas, os quais tiveram as menores CIMs e CBMs no testes de microdiluição, confirmando, assim, a existência de relação entre a concentração de punicalagina nos extratos e a atividade antimicrobiana. Machado *et al.* (2002) também verificaram a relação da concentração de punicalagina em produtos derivados da *Punica granatum* L. com a intensidade da atividade antibacteriana, indicando que essa substância poderia ser utilizada como marcador ativo para padronização desses produtos.

Considerando que o controle positivo de penicilina G foi testado na concentração preconizada para ensaios microbiológicos de avaliação da sensibilidade de antibiótico, e que essa concentração está relacionada com a concentração sérica (CLSI, 2012b), a comparação entre os halos de inibição do antibiótico e dos ESFs para estimativa do potencial antibacteriano dos mesmos é válida e relevante. Desse modo, é possível inferir que os ESFs 11 e 19 podem ter uma atividade antibacteriana significativa para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, já que os diâmetros dos halos de inibição deles foram relativamente próximos aos halos obtidos para a penicilina G (**Tabela 25**).

As diferenças entre os diâmetros dos halos entre os vários ESFs comerciais evidencia o impacto que a adulteração e ou degradação do extrato pode ter sobre a eficácia do fitoterápico. A partir desses resultados, é possível inferir que os ESFs, dependendo da sua composição fitoquímica e da integridade, marcada especialmente pela presença dos constituintes naturais na forma íntegra, podem ser uma boa alternativa como adjuvantes no tratamento de infecções por algumas cepas bacterianas, potencializando o efeito terapêutico e auxiliando na redução da dose utilizada (dependendo da situação) ou ainda evitando a necessidade de uso de associações de antibióticos mais potentes (DEY *et al.*, 2012).

Nesse estudo, ficou evidente a variação da resposta biológica para ESFs de mesmo lote de fabricação, mas que foram distribuídos para farmácias distintas. Os ESFs 14 e 15 se enquadram nessa situação e tiveram teores de punicalagina e respostas distintos, provavelmente por condições inadequadas de transporte e armazenamento (**Tabelas 23 e 25**).

Tabela 25 – Diâmetro dos halos de inibição em milímetros obtidos na avaliação da atividade antibacteriana dos ESFs pelo método de difusão em ágar para as cepas testadas e teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs.

ESFs	Teores (% p/p) ⁶		Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
	AE	PN	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
1	98,37	- ⁷	-	-	10
2 ¹	46,74	- ⁷	-	-	10
3 ¹	52,93	- ⁷	13	-	12
4	60,11	- ⁷	-	-	9
5	44,80	- ⁷	-	10	11
6 ²	66,57	- ⁷	13	-	12
7 ²	45,14	- ⁷	-	-	10
8 ³	48,48	- ⁷	-	-	10
9 ³	49,16	- ⁷	11	-	12
10	44,08	- ⁷	-	-	12
11	4,48	11,25	14	18	18
12	- ⁷	3,17	-	11	12
13	- ⁷	3,47	-	11	12
14 ⁴	- ⁷	3,19	-	11	12
15 ⁴	- ⁷	3,47	-	12	12
16	- ⁷	4,88	9	14	14
17	- ⁷	4,73	10	16	16
19 ⁵	- ⁷	19,97	16	20	20
Penicilina G	-	-	24	39	30

¹Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140329).

²Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (130315).

³Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (140206).

⁴Extratos provenientes de farmácias diferentes, mas de mesmo lote de fabricação (1/1).

⁵Extrato controle.

⁶Teores de AE e PN calculados no ensaio de doseamento por CLAE-UV (item 4.4.3) para os ESFs.

⁷Valores menores que o limite inferior de quantificação (LIQ) e maiores que o limite inferior de detecção (LID).

AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

III.4.2 Avaliação da atividade antioxidante dos ESFs

O uso do MTT para determinação da capacidade antioxidante de extratos vegetais não é corriqueiro, sendo mais prevalente a utilização de métodos como sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), do radical peroxil (ORAC) e do peróxido de hidrogênio, co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e FRAC (Ferric Reducing/Antioxidant Capacity) (CERDÁ *et al.*, 2004; JOSEPH *et al.*, 2012; LUCCI *et al.*, 2015; NEGI; JAYAPRAKASHA, 2003). Entretanto, considerando que a redução de sais tetrazólicos em formazans possui mecanismo amplamente conhecido e

estabelecido há décadas, que existem diversos métodos com aplicações distintas para o MTT e que esse sal sofre redução por diversas substâncias antioxidantes (ALTMAN, 1976; MEDINA *et al.*, 2007), a utilização do método padronizado por Duarte (2012) para o objetivo proposto no presente trabalho, é adequada e pode ser uma alternativa simples para mensurar o potencial antioxidante de fitoterápicos e de substâncias isoladas.

Além da simplicidade e da disponibilidade dos reagentes necessários para o ensaio no laboratório, o principal motivo para escolha desse método foi a possibilidade de aplicá-lo tanto na análise dos ESFs em solução, quanto nas amostras de plasma de camundongos e/ou de humanos após administração de ESFs comerciais, para avaliar se as concentrações plasmáticas das substâncias antioxidantes dos extratos promovem alteração do *status* antioxidante do plasma.

Os resultados das absorvâncias (amostra - branco) obtidas para os padrões de ácido elágico e punicalagina, para o controle positivo e para cada ESF, assim como as %AC estão descritas na **Figura 17**. A escolha do ácido ascórbico como controle positivo do ensaio foi efetiva e realizada com base no seu uso amplo e tradicional como antioxidante em diversas áreas, incluindo testes para avaliação da capacidade antioxidante de substâncias ativas e de produtos fitoterápicos (AQIL *et al.*, 2012; FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; JOSEPH *et al.*, 2012; LUCCHI *et al.*, 2015).

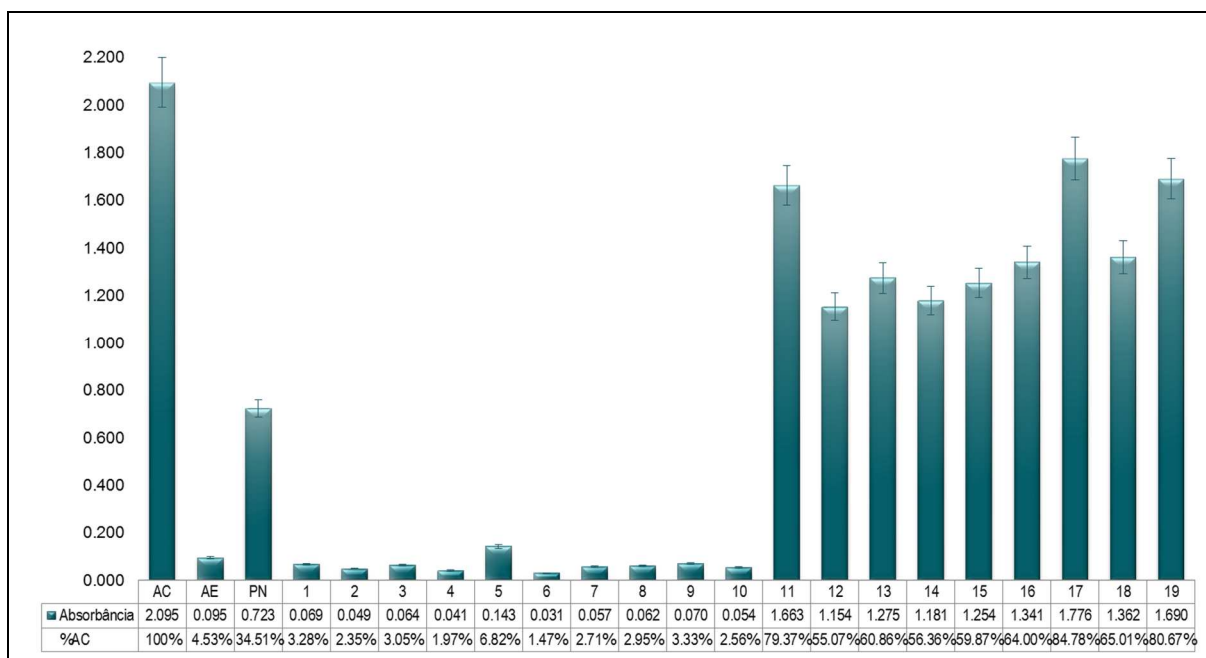
A relação entre as respostas obtidas e as concentrações dos marcadores ativos monitorados nesse trabalho foi nítida e expressiva, de modo que tanto o padrão de ácido elágico, quanto os ESFs com elevados teores dessa substância (ESFs 1 a 10: > 40%, p/p de ácido elágico) tiveram baixos valores de absorvância e de %AC (< 7,00%), indicando reduzida capacidade de conversão do MTT em formazam (baixo potencial antioxidante). Em contrapartida, tanto a punicalagina pura, quanto os ESFs com baixo teor de ácido elágico (< 5,00%, p/p) e maior de punicalagina, tiveram uma resposta elevada, com %AC de 34,51% para a punicalagina e de 55,07% a 84,78% para os ESFs. Os maiores potenciais antioxidantes foram obtidos para os ESFs 11, 17 e 19, os quais possuem as maiores concentrações de punicalagina. O ESF controle (19) teve a segunda maior resposta (80,67%), enfatizando a importância da

CAPÍTULO III

autenticidade e dos modos de produção e armazenamento adequados. Além disso, esses resultados são um forte indício da existência de sinergismo entre os constituintes naturais dos ESFs, já que a %AC do padrão de punicalagina (34,51%) foi 1,6 vezes inferior a menor %AC obtida dentre os ESFs 11 a 19 (55,07% para o ESF 12, o qual tem teor calculado de punicalagina de apenas 3,17%, p/p).

Todos esses resultados evidenciam o grande impacto negativo que a adição excessiva de apenas um componente ativo no extrato pode ter sobre a capacidade antioxidante e, conseqüentemente, em todas as demais atividades biológicas relacionadas a esse potencial. Esse desequilíbrio impacta não apenas nos resultados clínicos obtidos com produtos de administração oral, mas também naqueles de uso tópico, principalmente na área de cosmética e estética em que a atividade antioxidante é a principal justificativa de uso da *Punica granatum* L.

Figura 17 – Absorvâncias (amostra - branco) e %AC obtidas para os padrões de ácido elágico e punicalagina, para o controle positivo e para cada ESF.



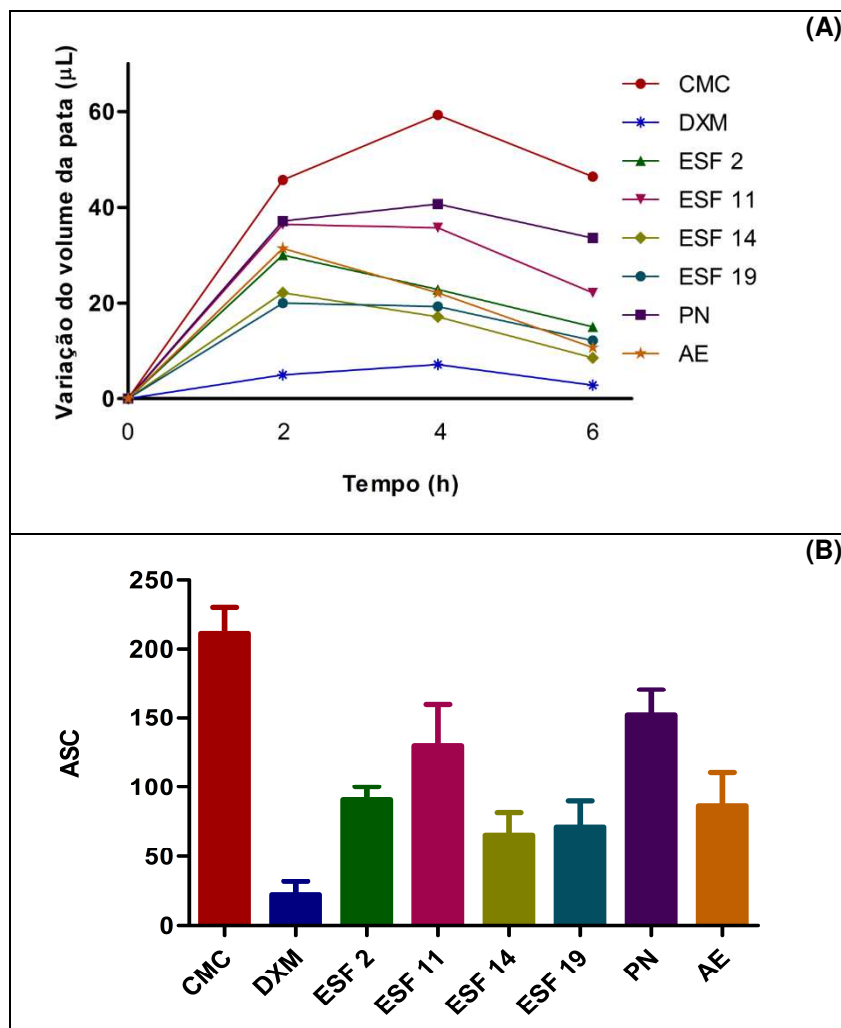
%AC: percentual da capacidade antioxidante em relação ao ácido ascórbico. AE: ácido elágico. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

III.4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos ESFs

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina em camundongos já foi utilizado em outros estudos para avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos derivados da *Punica granatum* L., sendo obtida uma resposta dose-dependente (LEE *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013). No presente trabalho, essa técnica foi aplicada com sucesso, permitindo a comparação das respostas geradas por ESFs com diferentes composições em termos do teor de ácido elágico e punicalagina.

Simultaneamente, foi realizada a análise dos padrões de ácido elágico e punicalagina para avaliação de qual dessas duas substâncias tem maior contribuição no controle da inflamação. Foi realizada apenas a comparação indireta das respostas de ácido elágico e punicalagina com os ESFs, em decorrência da diferença entre as doses administradas, já que, por carência de grande quantidade dos ativos, pela expectativa de um maior efeito observado e por relatos prévios na literatura, foi empregada uma dose 10 vezes menor que a dos ESFs (LEE *et al.*, 2010; MO *et al.*, 2013). As curvas de variação do volume da pata ao longo do tempo e as áreas sob as curvas (ASCs) obtidas para os controles positivo e negativo, ESFs e padrões estão representadas na **Figura 18**.

Figura 18 – Curvas de variação do volume da pata ao longo do tempo (A) e ASCs (B) para os controles positivo e negativo, ESFs e padrões.



Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle negativo – $p < 0,05$.
 AE: ácido elágico. ASC: área sob a curva. CMC: carboximetilcelulose. DXM: dexametasona. ESF: extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* L. PN: punicalagina.

É possível observar que entre 0 h e 2 h após o estímulo inflamatório, a inclinação da curva de variação do volume de pata obtida para a punicalagina é maior que a obtida para o ácido elágico, indicando uma menor redução/contenção da inflamação. Esse fato pode ser um reflexo da diferença entre parâmetros farmacocinéticos dessas duas substâncias, pois o ácido elágico atinge a $C_{máx}$ entre 1 h e 1,5 h antes da punicalagina (tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida ($t_{máx}$) = 2 h) (MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; MOGHADDAM *et al.*, 2014; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015; YAN *et al.*, 2014).

Embora na primeira medida do volume de pata (2 h) a diferença entre os efeitos do ácido elágico e da punicalagina não tenha sido estatisticamente significativa, nas próximas horas (2 h a 6 h) o ácido elágico promoveu uma queda acentuada no edema, levando a um perfil diferente tanto da CMC, quanto da DMX, o que não ocorreu com a punicalagina. A rápida metabolização desse ácido, levando à formação de vários metabólitos ativos, pode ser a razão para esse comportamento (MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; MOGHADDAM *et al.*, 2014; NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Em comparação com a DXM, a grande diferença para a punicalagina está na contenção inicial da inflamação (2 primeiras horas), que é pouco expressiva. Já entre 2 h e 6 h, os perfis são semelhantes, havendo pouca mudança no volume de pata entre as três determinações. Provavelmente, esse comportamento está associado à metabolização mais lenta da punicalagina e à maior dificuldade de absorção, devido à polaridade e ao tamanho molecular elevados (MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; MOGHADDAM *et al.*, 2014; NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; VORA; LONDHE; PANDITA, 2015). Como resultado do perfil observado, a ASC da punicalagina foi superior à do ácido elágico, indicando que, isoladamente, o ácido elágico tem maior potencial para redução da inflamação aguda.

A existência de uma atividade anti-inflamatória de ácido elágico e punicalagina, demonstrada por meio das ASCs, aliada à observação das curvas de variação do volume de pata, nas quais tanto o ácido elágico quanto a punicalagina levam a volumes bem maiores na medida de 2 h que aqueles obtidos para a DXM, indica que o mecanismo de inibição da inflamação aguda pode estar envolvido com a fase tardia, caracterizada pela presença de prostaglandinas, de modo que a ação no estágio exsudativo não é tão expressiva (MO *et al.*, 2013).

A avaliação dos quatro ESFs, com teores distintos de ácido elágico e punicalagina, levou à observação de perfis e ASCs variáveis e estatisticamente diferentes entre si, não havendo uma correlação direta e simples entre as respostas e a concentração de apenas um marcador ativo. A ordem crescente de potencial anti-inflamatório e decrescente de ASC obtida foi: 11 < 2 < 19 < 14.

O ESF 2, representante da classe de ESFs com teor declarado no laudo de 40% (p/p) de ácido elágico e calculado de 44,91% (p/p), teve um perfil muito semelhante ao do

ácido elágico. Considerando que a cor do extrato (item II.4.1) é muito semelhante à cor do padrão de ácido elágico, podemos supor que a resposta similar obtida, corroborada pelo baixo teor de punicalagina, pode estar associada à reduzida concentração de demais componentes naturais do extrato, devido à adição excessiva de ácido elágico.

Embora o ESF 14 com teor declarado de 7,04% (p/p) de taninos, tenha, juntamente com o ESF 19, o menor teor de ácido elágico dentre os 4 extratos analisados (< LIQ e > LID), ele também tem uma baixa concentração de punicalagina (3,19%, p/p). Isso pode ser um indício de maior autenticidade, com preservação dos constituintes naturais, de modo que a provável ocorrência de sinergismo entre essas substâncias (e outras possivelmente presentes nos extratos), pode ter levado à maior redução e contenção da inflamação entre os ESFs testados. Além disso, é interessante observar que o perfil da curva desse extrato também foi semelhante ao do ácido elágico, provavelmente em decorrência da presença de outras substâncias com características parecidas, como o ácido gálico e outras moléculas simples. Essas substâncias podem ter potencializado o efeito, compensando o baixo teor desse marcador, quando comparado ao ESF 2.

Os últimos dois ESFs (11 e 19), que contêm elevadas concentrações de punicalagina (11,25% e 19,97%, p/p, respectivamente), tiveram um perfil semelhante ao desse marcador, sem alteração significativa do edema entre a 2ª e 4ª hora após administração do estímulo inflamatório. Isso pode estar relacionado não apenas ao elevado teor de punicalagina, mas também à presença de outros elagitaninos com propriedades farmacocinéticas semelhantes. Embora o ESF 11 tenha apresentado a menor atividade anti-inflamatória, a redução do edema de 4 h a 6 h foi a maior entre os extratos testados e com inclinação semelhante ao ácido elágico, o que também pode ser um indício da presença de substâncias semelhantes a esse ácido.

Todos esses fatos observados na análise dos resultados obtidos indicam que o uso de ESFs via oral pode trazer benefícios no controle ou prevenção de processos inflamatórios, e evidenciam o quanto a composição de um ESF pode influenciar na resposta terapêutica. Essas variações observadas para a atividade anti-inflamatória podem ocorrer também para outras aplicações, e está relacionada à complexidade

fitoquímica de produtos naturais e aos diversos fatores que podem influenciar a composição e proporção dos constituintes.

O estudo foi interessante para evidenciar a importância da manutenção de características naturais de fitoterápicos, sem adição excessiva de um único marcador ativo. Esse fato é claramente percebido na comparação das ASCs dos ESFs 2 e 14, em que o extrato com baixos teores de ácido elágico e punicalagina teve uma resposta melhor que aquele com elevado teor de apenas um constituinte, ainda que esse constituinte tenha uma boa resposta quando isolado. A existência de sinergismo é um fator importante para as vantagens obtidas no uso de produtos naturais, permitindo a eficácia terapêutica mesmo com baixas concentrações de ativos. Esse é um fator extremamente marcante para a segurança, pois o sinergismo evita o uso de doses elevadas de uma única substância, reduzindo a ocorrência de efeitos tóxicos e reações adversas exacerbadas (MO *et al.*, 2013).

III.4.4 Avaliação do impacto dos ESFs sobre a hemostasia

A proposta de avaliação do impacto sobre a hemostasia foi fomentada pelo fato de o ácido elágico ser, sabidamente, um fator de contato, ativador da via intrínseca da coagulação. Isso porque substâncias capazes de fornecer elétrons, como o ácido elágico e outros constituintes dos ESFs, podem atuar como ativador da via intrínseca, aumentando a coagulação e, conseqüentemente, reduzindo o TTPA (TTPA CLOT, 2014).

ESFs produzidos sob condições corretas e controladas possuem baixo teor de ácido elágico (menos que 5% (p/p) nos extratos secos da casca) (BORGES; CROZIER, 2012; MARTIN *et al.*, 2009; MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006), de modo que a possibilidade de impactar na hemostasia seria baixa. Entretanto, caso o teor de ácido elágico esteja muito elevado, como observado para os ESFs 1 a 10, há a possibilidade de que seja atingido um nível de concentração plasmática significativo, podendo ocasionar a ativação excessiva da via intrínseca, aumentando a coagulação e ocasionando complicações tromboembólicas a longo prazo, em consequência do uso contínuo dos ESFs.

Por isso, foi avaliado o impacto *in vitro* sobre a hemostasia por meio da determinação automatizada do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e do tempo de protrombina (TP) em plasma humano citratado. Variações no TP indicam influência sobre a via extrínseca da coagulação por alteração dos fatores dependentes da vitamina K (II, VII, IX e X) e da concentração de cálcio (Ca^{2+}) na amostra (TP CLOT, 2014), de modo que não era esperada a obtenção de valores alterados nesse teste tanto para os ESFs (1 a 19), quanto para as soluções padrão de ácido elágico em concentrações crescentes.

Por outro lado, na avaliação do TTPA, teste usado para verificação de alterações na via intrínseca da coagulação, esperava-se identificar uma redução no tempo de coagulação com o aumento da concentração de ácido elágico nas soluções padrão desse marcador em plasma, além de tempos de coagulação menores para os ESFs de 1 a 10 do que os tempos obtidos para os ESFs de 11 a 19.

As amostras de pool de plasma branco (sem adição de ácido elágico ou ESFs), utilizadas como controle para verificação da qualidade e funcionamento do método, equipamento, reagente e do próprio plasma, apresentaram valores normais, dentro da faixa de tempo padrão (TP de 10 a 14 segundos e TTPA de 30 a 45 segundos).

Na análise dos tempos de coagulação obtidos para as curvas de ácido elágico e para os ESFs, tanto para o teste de TP, quanto para o de TTPA, não foram observadas alterações significativas nos tempos de coagulação (redução dos tempos) com o aumento da concentração de ácido elágico. O resultado obtido para o TP é coerente com o esperado, já que o ácido elágico não está envolvido na via extrínseca da coagulação. Entretanto, para o TTPA os resultados foram inesperados, já que mesmo em concentrações elevadas (100000,00 ng/mL), não houve redução nos tempos de coagulação.

A primeira hipótese para esse resultado é baseada na confirmação de que nas possíveis concentrações plasmáticas encontradas após uso contínuo de ESFs, o ácido elágico não impacta na coagulação sanguínea. Entretanto, deve-se considerar também que o teste realizado pode não ter sensibilidade adequada para identificar pequenas alterações no perfil de coagulação. Essa é uma hipótese que deve ser

levada em consideração, sendo extremamente válido realizar novos ensaios utilizando métodos mais sensíveis, como, por exemplo, o Teste de Geração de Trombina. Esse teste consiste na determinação quantitativa da cinética e da capacidade do plasma em gerar trombina *in vitro*, por meio do uso de um fluorímetro, permitindo a avaliação contínua da geração de trombina no plasma após adição de ativadores (fator tissular, fosfolípidos e cloreto de cálcio) (HEMKER *et al.*, 2003; MARCHETTI, 2008). Ainda é um teste relativamente recente, não existindo protocolos bem estabelecidos para uso em laboratórios de análises clínicas, mas vem sendo estudado no meio científico com diversas aplicações, por possuir boa sensibilidade para a identificação de alterações na hemostasia, tanto de estados de hipo quanto de hipercoagulabilidade (MARCHETTI *et al.*, 2012; ZAGO *et al.*, 2013).

III.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Observa-se que, embora haja diversos relatos na literatura da existência de atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória para produtos derivados da *Punica granatum* L. (FAWOLE; MAKUNGA; OPARA, 2012; ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012; JURENKA, 2008; LANDETE, 2011; MEDJAKOVIC; JUNGBAUER, 2013; SREEKUMAR *et al.*, 2014), estudos, mesmo *in vitro*, realizados com ESFs comerciais são muito escassos. Outras carências na literatura são: (1) a avaliação científica do impacto do uso desses ESFs via oral sobre parâmetros fisiológicos, como a hemostasia e (2) a avaliação consistente e sólida da eficácia, por meio de estudos pré-clínicos e clínicos para as indicações propostas no meio comercial.

Nesse trabalho, a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliação de algumas das atividades biológicas atribuídas aos ESFs na literatura e nos sites ou estabelecimentos de farmácias de manipulação e lojas de produtos naturais, utilizando os ESFs comerciais, permitiu a comparação das respostas obtidas para os extratos, com aquelas obtidas para os padrões dos marcadores ativos ácido elágico e punicalagina. Essa comparação, associada à correlação com os teores de ácido elágico e punicalagina nos ESFs, permitiu a verificação do impacto que diferenças na composição desses produtos podem ter sobre as respostas biológicas, levando à obtenção de informações relevantes e de grande importância, tanto para o meio científico, quanto para indústrias, farmácias de manipulação e para a população.

De um modo geral, nos estudos realizados, ficou evidente a superioridade de extratos em que foram mantidas as características naturais, sem adição excessiva de um único marcador ativo. As atividades antibacterianas e antioxidante mais intensas foram obtidas para os ESFs de cor amarronzada ou amarelada, os quais tem teores baixos de ácido elágico e mais altos de punicalagina, como é esperado para um ESF preparado sob condições adequadas, como o ESF 19.

A avaliação da atividade antioxidante é extremamente válida e relevante, pois essa é a base para uma série de indicações dos ESFs, principalmente com apelo estético, nas farmácias de manipulação e lojas de produtos naturais, tais como: prevenção e combate de rugas e marcas de expressão, melhora no aspecto geral da pele com

aumento da hidratação e maciez e clareamento de manchas de pele (hipercromias melanodérmicas).

A atividade anti-inflamatória foi o único ensaio realizado *in vivo* e permitiu demonstrar a importância da realização desses tipos de ensaios e não apenas de testes *in vitro*. Isso porque em estudos utilizando animais, é possível incluir o impacto não apenas das concentrações dos marcadores ativos nos ESFs, mas também a influência de outros parâmetros, tais como velocidade de absorção e metabolização dos componentes dos ESFs, formação de metabólitos ativos, dentre outros. Entretanto, tanto nos ensaios *in vitro* quanto no ensaio *in vivo*, foi possível verificar a ocorrência de sinergismo, sendo obtidas, muitas vezes melhores respostas biológicas para ESFs com teores baixos de ambos os marcadores ativos avaliados (ácido elágico e punicalagina).

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

“Por aqui, contudo, não olhamos para trás por muito tempo. Seguimos em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas... e curiosidade nos conduz a novos caminhos.”

(Walt Disney)

IV.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a aplicação dos ensaios de controle de qualidade físico-químicos e biológicos na análise dos 18 ESFs comerciais, utilizando sempre o ESF controle produzido no laboratório e os padrões de ácido elágico e punicalagina como comparação, foi possível identificar a ampla variabilidade existente no mercado quanto à composição desses produtos.

Essa variabilidade ficou evidente tanto na diferença entre as cores dos ESFs, nas manchas obtidas na CCD e nos teores de taninos totais, ácido elágico e punicalagina, quanto nas respostas biológicas obtidas nos ensaios *in vitro* ou *in vivo* realizados para avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória. É possível dividir os ESFs comerciais em 2 grandes grupos: (1) ESFs de cor cinza com teores elevados de ácido elágico e baixos de punicalagina e taninos totais; e (2) ESFs de cor marrom ou amarela com teores baixos de ácido elágico e maiores de punicalagina e taninos totais, de modo que as respostas obtidas nos ensaios biológicos foram, de um modo geral, coerentes com essa divisão, havendo uma relação direta entre a composição dos ESFs e as atividades biológicas.

Com a realização dos estudos biológicos, também foi possível verificar que a adição excessiva de substâncias ativas isoladas aos ESFs, na intenção de padronizar e/ou aumentar as atividades biológicas, descaracteriza o produto, deixando de ser considerado fitoterápico, e passando a ser denominado medicamento específico. Essa prática deve ser monitorada e controlada rigorosamente, já que a presença de substâncias ativas em altas concentrações no extrato pode levar a um maior risco à saúde do paciente. Existem normas e critérios diferentes para a produção, registro e controle de qualidade de medicamentos específicos.

Além disso, nem sempre o resultado esperado (aumento da resposta biológica) é alcançado, pois, em geral, quando trata-se de produtos naturais, uma atividade biológica significativa não está atribuída a apenas um marcador ativo, mas a um conjunto de substâncias presentes no produto que possuem ação sinérgica, aumentando o efeito biológico, quando comparado à substância isolada na mesma

concentração. Um exemplo dessa característica foi observado no ensaio para avaliação da atividade antioxidante, em que os ESFs do grupo 2 (cor marrom ou amarela com teores baixos de ácido elágico e maiores de punicalagina e taninos totais) apresentaram maior potencial antioxidante do que o padrão de punicalagina.

Diante do exposto, é clara a importância da ação das agências regulatórias e fiscalizadoras sobre a produção e comercialização de ESFs, sendo fundamental a exigência de realização de ensaios de controle de qualidade, estabelecendo criteriosamente os parâmetros e limites avaliados e aumentando o rigor da fiscalização, de modo a garantir o efeito biológico e a segurança do paciente.

A demonstração do impacto que diferenças na composição dos ESFs têm sobre as atividades biológicas serve como um alerta aos produtores, distribuidoras, farmácias de manipulação, e à população de um modo geral, para os impactos que o uso de cápsulas de ESFs adquiridas em diferentes lugares pode trazer à saúde do consumidor. O cuidado com os ESFs para manutenção da qualidade não deve ser restrito ao processo de produção, mas mantido ao longo de toda a vida útil do produto, incluindo condições de transporte, manuseio na rotina e armazenamento nos estabelecimentos comerciais e por parte do paciente.

IV.2 CONCLUSÃO

Após vasto contato com mais de 75 farmácias magistrais, indústrias e distribuidoras de fitoterápicos e produtos naturais, foram adquiridos 18 ESFs comerciais de fontes diversas, os quais são representativos da variabilidade existente no mercado, em relação à composição. Considerando essa diversidade, foi produzido um extrato no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG, o qual foi utilizado satisfatoriamente como controle e comparação em todos os ensaios realizados nesse trabalho.

Na realização do controle de qualidade físico-químico dos ESFs, além da avaliação de características como cor, odor, granulometria e umidade, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos para identificação por CCD e determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina por CLAE-UV e do teor de taninos totais por método espectrofotométrico miniaturizado. A validação foi realizada conforme recomendações das diretrizes regulatórias vigentes no Brasil para análise qualitativa e quantitativa de fitoterápicos, de modo que os três métodos foram considerados adequados para aplicação na análise de ESFs comerciais.

Os resultados obtidos na identificação e determinação dos teores de taninos totais e de ácido elágico e punicalagina foram concordantes entre si e com o aspecto dos ESFs, indicando que extratos de cor cinza possuem elevados teores de ácido elágico e baixos de punicalagina e taninos totais, ao passo que extratos de cor marrom ou amarela possuem altos teores de punicalagina e de taninos totais e baixos teores de ácido elágico.

As respostas biológicas obtidas nos ensaios de avaliação das atividades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante foram dependentes das concentrações dos marcadores ativos nos ESFs. Para ESFs com altos teores de punicalagina e de taninos totais e baixos teores de ácido elágico foram obtidas as melhores respostas nos ensaios para avaliação das atividades antibacterianas e antioxidantes, ao contrário do observado para a atividade anti-inflamatória. Além disso, foi possível verificar a ocorrência de sinergismo entre os componentes dos ESFs, por meio da

comparação dos resultados obtidos para os padrões e para os ESFs, evidenciando a importância da manutenção das características naturais dos extratos, sem a adição excessiva de marcadores ativos isolados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S.H.; MASHOUF, R.Y.; MORTAZAVI, H.; MOGHADDAM, M.H.; ROOZBAHANI, N.; VAHEDI, M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica Granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**, Tehran, v. 8, n. 1, p. 1 - 6, 2011.

ABID, M.; YAICH, H.; CHEIKHROUHOUS, S.; KHEMAKHEM, I.; BOUAZIZ, M.; ATTIA, H.; AYADI, M.A. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. **Journal of Food Science and Technology**, New Deli, v. 54, n. 9, 2890 - 2901, 2017.

ACÁCIA Farmácia de Manipulação. Disponível em: <<http://www.acaciadeamericana.com.br/pomegranate-225mg-60-capsulas.html>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

AL-ZORECK, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 134, n. 3, p. 244 - 248, 2009.

ALTMAN, F.P. Tetrazolium salts and formazans. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Stuttgart, v. 9, n. 3, p. 1 - 56, 1976.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202 - 2210, 2010.

ALVES, M.M.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Scientia Plena**, Aracaju, c. 7, n. 12, p. 1 - 8, 2011.

AMDEKAR, S.; ROY, P.; SINGH, V.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. **International Journal of Inflammation**, New York, v. 2012, p. 1 - 6, 2012.

AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; SOBRINHO, T.J.S.P.; ARAÚJO, T.A.S.; ALBUQUERQUE, U.P.A. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and

REFERÊNCIAS

ethnopharmacology. **Functional Ecosystems Communities**, v. 2, n. 1, p. 88 - 94, 2008.

AMRI, Z.; ZAOUAY, F.; LAZREG-AREF, H.; SOLTANA, H.; MNERI, A.; MARS, M.; HAMMAMI, M. Phytochemical content, Fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: Comparison between edible and non edible varieties grown in Tunisia. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 104, p. 274 - 280, 2017.

AMYRGIALAKI, E.; MAKRIS, D.P.; MAUROMOUSTAKOS, A.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 216 - 222, 2014.

AQIL, F.; MUNAGALA, R.; VADHANAM, M.V.; KAUSAR, H.; JEYABALAN, J.; SCHULTZ, D.J.; GUPTA, R.C. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 345 - 353, 2012.

BACHOUAL, R.; TALMOUDI, W.; BOUSSETTA, T.; BRAUT, F.; EL-BENNA, J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase *in vitro* and attenuates lung inflammation in mice. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 49, n. 6, p. 1224 - 1228, 2011.

BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M.N.V.R. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 40, n. 1, p. 206 - 210, 2006.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Xi'an, v. 6, n. 1, 71 - 79, 2016.

BANERJEE, N.; TALCOTT, S.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S.U. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells *in vitro* and *vivo*: potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 136, n. 1, p. 21 - 34, 2012.

BARROS, Zilmar Meireles Pimenta. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto**. 2011. 84 f. Dissertação

REFERÊNCIAS

(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. 317p.

BEKIR, J.; MARS, M.; SOUCHARD, J.P.; BOUAJILA, J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 55, p. 470 - 475, 2013.

BORGES, G.; CROZIER, A. Short communication. HPLC–PDA–MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages. **Food Chemistry**, Reading, v. 135, n. 1, p. 1863 - 1867, 2012.

BRAGA, T.V.; DORES, R.G.R.; RAMOS, C.S.; EVANGELISTA, F.C.G.; TINOCO, L.M.S.; VAROTTI, F.P.; CARVALHO, M.G.; SABINO, A.P. Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves. **American Journal of Plant Sciences**, Quilcene, v. 5, n. 23, p. 3492 - 3500, 2014.

BRANDÃO, M.G.; BANDEIRA, C.C.; ANDRADE, G.T.B. *Circuito das Plantas Medicinais e Aromáticas de Belo Horizonte – Guia Informativo*. 1. ed. Belo Horizonte: Gráfica O Lutador, 2003. 68 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), de 6 de março de 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>> Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mar. 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0010_09_03_2010.pdf/521bc231-d4d8-4a55-9cc7-b609ce418b50>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012a. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e

REFERÊNCIAS

pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2012a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2013c. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2014a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014b. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+\(2\).pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+(2).pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6)>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de respostas aos questionamentos recebidos pela COFID em 2014c. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRÊTAS, J.M.; CÉSAR, I.C.; BRÊTAS, C.M.; TEIXEIRA, L.S.; BELLORIO, K.B.; MUNDIM, I.M.; PIANETTI, G.A. Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of naproxen and sumatriptan in human plasma: application to a pharmacokinetic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 15, p. 3981 - 3992, 2016.

REFERÊNCIAS

BRIGHENTI, V.; GROOTHUIS, S.F.; PRENCIPE, F.P.; AMIR, R.; BENVENUTI, S.; PELLATI, F. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1480, p. 20 - 31, 2017.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, São Paulo, v. 55, n.3, p. 37 - 39, 2003.

ÇAM, M.; İÇYER, N.C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 3, p. 1489 - 1497, 2013.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. **Cancer Research**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 943 - 946, 1987.

CERDÁ, B.; ESPÍN, J.C.; PARRA, S.; MARTÍNEZ, P.; TOMAS-BARBERAN, F.A. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6- one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v.43, n. 4, p. 205 - 220, 2004.

CHAN, K.; LEUNG, K.S-Y.; ZHAO, S.S. Harmonization of monographic standards is needed to ensure the quality of Chinese medicinal materials. **Chinese Medicine**, London, v. 4, n. 18, p. 1 - 5, 2009.

CHOI, J.G.; KANG, O.H.; LEE, Y.S.; CHAE, H.S.; OH, Y.C.; BRICE, O.O.; KIM, M.S.; SOHN, D.H.; KIM, H.S.; PARK, H.; SHIN, D.W.; RHO, J.R.; KWON, D.Y. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-A2**. Wayne, v. 22, n. 15, 30 p., 2002.

REFERÊNCIAS

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M07-A9.** Wayne, v. 32, n. 2, 68 p., 2012a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M02-A11.** Wayne, v. 32, n. 1, 58 p., 2012b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S25.** Wayne, v. 35, n. 3, 236 p., 2015.

CORRÊA, M.P.; PENNA, L.A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

DAMY, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; DE FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 103 - 111, 2010.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 21 - 25, 1998.

DELL, R.B.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample size determination. **ILAR Journal**, Washington, v. 43, n. 4, p. 207 - 213, 2002.

DERMO MANIPULACOES Farmácia de Manipulação. Disponível em: <<http://www.dermomanipulacoes.com.br/produtos/pomegranate-350mg-extrato-clarea-dor-da-pele/>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

DEWI, M.A.; RATNAWATI, J.; PURWASIH, R.W. Determination of total tannin of white and red rind pomegranate (*Punica granatum* L.) by Colorimetry method using reagent 1, 10 phenantroline. **Procedia Chemistry**, v. 13, p. 214 - 217, 2014.

DEY, D.; DEBNATH, S.; HAZRA, S.; GHOSH, S.; RAY, R.; HAZRA, B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 50, n. 12, p. 4302 - 4309, 2012.

REFERÊNCIAS

DICIAULA, M.C.; LOPES, G.C.; SCARMINIO, I.S.; MELLO, J.C.P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, p. 158 - 163, 2014.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; JUPILLE, T. H.; WILSON, N. S. Variability of column selectivity for reversed-phase high-performance liquid chromatography. Compensation by adjustment of separation conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 51 - 67, 2002.

DUARTE, Rita Carolina Figueiredo. **Efeito do ácido acetilsalicílico na ativação plaquetária e perfil oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1988.

ECKELMAN, W.C.; KILBOUM, M.R.; JOYAL, J.L.; LABIRIS, R.; VALLIANT, J.F. Justifying the number for each experiment. **Nuclear Medicine and Biology**, New York, v. 34, n. 3. p. 229 - 232, 2007.

European Pharmacopoeia (9th Edn.). European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM): France. 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products**. London, mar. 2011. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2018.

FAKHRI, E.; PETROCZI, A.; NAUGHTON, D.P. Assessing the efficacies of phenolic compounds in pomegranate juice using thin layer chromatography. **Acta Chromatographica**, Katowice, v. 26, n. 3, p. 563 - 573, 2014.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. (orgs.). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2001. p. 199 - 222.

FARMACOPEIA Brasileira, 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

REFERÊNCIAS

FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

FAVARIN, D.C.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, E.L.; ALVES, C.F.; CHICA, J.E.L.; SORGI, C.A.; FACCIOLI, L.H.; ROGERIO, A.P. Anti-Inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2013, p. 1 - 13, 2013.

FAWOLE, O.A.; MAKUNGA, N.P.; OPARA, U.L. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v.12, n.1, p. 1 - 11, 2012.

FEREIDONI, M.; AHMADIANI, A.; SEMNANIAN, S.; JAVAN, M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 43, n. 1, p. 11 - 14, 2000.

FERNANDES, L.; PEREIRA, J.A.; LOPÉZ-CORTÉS, I.; SALAZAR, D.M.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; RAMALHOSA E. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. **European Food Research and Technology**, v.243, n. 10, p. 1799 - 1814, 2017.

FERREIRA, S.H. A new method for measuring variations of rat paw volume. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 31, n. 9, p. 648, 1979.

FISCHER, U.A.; JAKSCH, A.V.; CARLE, R.; KAMMERER, D.R. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits and juices. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. p. 209 - 221, 2013.

FISCHER, U.A.; CARLE, R.; KAMMERER, D.R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). **Food Chemistry**, Reading, v.127, n. 2, p. 807 - 821, 2011.

FOLMER, F.; BASAVARAJU, U.; JASPARS, M.; HOLD, G.; EL-OMAR, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Anticancer effects of bioactive berry compounds **Phytochemistry**

REFERÊNCIAS

Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 295 - 322, 2014.

FORMULÁRIO de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011, 126p.

FOSS, S.R.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; ENDO, E.H.; FILHO, B.P.D. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Samsun, v.13, n.1, p. 32 - 37, 2014

GALEGO, L.R.; JOCKUSCH, S.; DA SILVA, J.P. Polyphenol and volatile profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extracts and liquors. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 693 - 700, 2013.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; VERARDO, V.; TOSELLI, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CABONI, M.F. Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC–DAD–ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 22, p. 5328 - 5337, 2013.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, v. 68, p. 305 - 309, 1996.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 23, p. 24866 - 24872, 2004.

GUO, S.; DENG, Q.; XIAO, J.; XIE, B.; SUN, Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing dna damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3134 - 3140, 2007.

HAJIMAHMOODI, M.; SHAMS-ARDAKANI, M.; SANIEE, P.; SIAVOSHI, F.; MEHRABANI, M.; HOSSEINZADEH, H.; FOROUMADI, P.; SAFAVI, M.; KHANAVI, M.; AKBARZADEH, T.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. *In vitro* antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 25, n. 11, p. 1059 - 1066, 2011.

REFERÊNCIAS

HANU, P.; HARMANPREET, S. Formulation and evaluation of niosomes containing punicalagin from peels of *Punica granatum*. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, Jhalawar, v. 2, n. 6, p. 56 - 67, 2012.

HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSENMAYER, K.E.; MCKEY, D. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 519 - 524, 2002.

HEMKER, H.C.; GIESEN, P.; AL DIERI, R.; REGNAULT, V.; DE SMEDT, E.; WAGENVOORD, R.; LECOMPTE, T.; BÉGUIN, S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 33, n. 1, p. 4 - 15, 2003.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027 - 1031, 2002.

HOWELL, A.B.; D'SOUZA, D.H. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, p. 1 - 11, 2013.

INTERNATIONAL Conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*. Geneva, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.143, n. 2, p. 397 - 405, 2012.

JANANI, J.; ESTHERLYDIA, D. Antimicrobial activities of *Punica granatum* extracts against oral microorganisms. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 5, n 3, p. 973 - 977, 2013.

JAYAKUMAR, R.; KANTHIMATHI, M.S. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. **Food Chemistry**, Reading, v. 126, n. 1, p. 956 - 960, 2011.

REFERÊNCIAS

JOSEPH, M.M.; ARAVIND, S.R.; VARGHESE, S.; MINI, S.; SREELEKHA, T.T. Evaluation of antioxidant, antitumor and immunomodulatory properties of polysaccharide isolated from fruit rind of *Punica granatum*. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 5, n. 2, p. 489 - 496, 2012.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, Sandpoint, v. 13, n. 2, p. 128 - 144, 2008.

KAHRAMANOGLU, I.; USANMAZ, S. *Pomegranate production and marketing*. 1 ed. Indianapolis: CRC Press, 2016, 148 p.

KHAN, J.A.; HANEE, S. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, London, v. 2, n. 3, p. 23 - 27, 2011.

KULKARNI, A.P.; ARADHYA, S.M.; DIVAKAR, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chemistry**, Reading, v. 87, n. 4, p. 551 - 557, 2004.

KUMAR, S.; JYOTIRMAYEE, K.; SARANGI, M. Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v. 18, n. 1, p. 126 - 132, 2013.

LANDETE, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, Ottawa, v. 4, n. 5, p. 1150 - 1160, 2011.

LANSKY, E.P. Short Communication. Beware of pomegranates bearing 40% ellagic acid. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v.9, n. 1, p. 119 - 122, 2006.

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 2, p. 177 - 206, 2007.

LANTZOURAKI, D.Z.; SINANOGLU, V.J.; ZOUMPOULAKIS, P.G.; GLAMOČLIJA, J.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; HEROPOULOS, G.; PROESTOS, C. Antiradical-

REFERÊNCIAS

antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum L.*) juices from different cultivars: a comparative study. **RSC Advances**, Cambridge, v. 5, p. 2602 - 2614, 2015.

LEE, C-J.; CHEN, L-G.; LIANG, W-L.; WANG, C-C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, Reading, v. 118, n. 2, p. 315 - 322, 2010.

LEMNIS Farmácia. Disponível em: <<http://www.lemnifarmacia.com.br/extrato-de-roma-pomegranate-um-potente-anti-oxidante/>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

LI, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, H.; JIA, J.; LV, L.; ZHOU, G.; CHAI, Y.; ZHANG, G. Comparative pharmacokinetics of prim-Oglucosylcimifugin and cimifugin by liquid chromatography–mass spectrometry after oral administration of Radix Saposchnikoviae extract, cimifugin monomer solution and prim-glucosylcimifugin monomer solution to rats. **Biomedical Chromatography**, London, v. 26, n. 10, p. 1234 - 1240, 2012.

LIMA, M.B.; ANDRADE, S.I.E.; HARDING, D.P.; PISTONESI, M.F.; BAND, B.S.F.; ARAÚJO, M.C.U. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. **Talanta**, v. 88, p. 717 - 723, 2012.

LOPES, K.P.; BRUNO, R.L.A.; BRUNO, G.B.; AZEREDO, G.A. Comportamento de sementes de romã (*Punica granatum L.*) submetidas à fermentação e secagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 369 - 372, 2001.

LOUGH, W.J.; WAINER, I. W. *High Performance Liquid Chromatography. Fundamental principals and practice*. 1 ed. Londres: Chapman & Hall, 1995, 276 p.

LUCCI, P.; PACETTI, D.; LOIZZO, M.R.; FREGA, N.G. *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant and antiproliferative activities. **Food Chemistry**, Reading, v. 15, n. 167, p. 475 - 483, 2015.

MACHADO, T.B.; LEAL, I.C.R.; AMARAL, A.C.F.; SANTOS, K.R.N.; SILVA, M.G.; KUSTER, R.M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 606 - 610, 2002.

MACHADO, T.B.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.; LEAL, I.C.; SILVA, M.G.; AMARAL, A.C.; KUSTER, R.M.; NETTO-DOSSANTOS, K.R. In vitro activity of Brazilian medicinal

REFERÊNCIAS

plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 279 - 284, 2003.

MADRIGAL-CARBALLO, S.; RODRIGUEZ, G.; KRUEGER, C.G.; DREHER, M.; REED, J.D. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. **Journal of Functional Foods**, London, v. 1, n. 3, p. 324 - 329, 2009.

MAGALDI, S.; MATA-ESSAYAG, S.; CAPRILES, C.H.; PEREZ, C.; COLELLA, M.T.; OLAIZOLA, C.; ONTIVEROS, Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 8, n. 1, p. 39 - 45, 2004.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1559 - 1568, 2010.

MALVIYA, S.; ARVIND; JHA, A.; HETTIARACHCHY, N. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 51, n. 12, p. 4132 - 4137, 2014.

MANSOUR, E.; BEN KHALED, A.; LACHIHEB, B.; ABID, M.; BACHAR, K.H.; FERCHICHI, A. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from tunisian pomegranate. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 15, n. 1, p. 1393 - 1403, 2013.

MARCHAND, D. H.; CROES, K.; DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VII cyanopropyl columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 1, p. 57 - 64, 2005.

MARCHETTI, M.; CASTOLDI, E.; SPRONK, H.M.; VAN OERLE, R.; BALDUCCI, D.; BARBUI, T.; ROSING, J.; TEN CATE, H.; FALANGA, A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 4061 - 4068, 2008.

MARCHETTI, M.; DIANI, E.; TEN CATE, H.; FALANGA, A. Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. **Haematologica**, v. 97, n. 8, p. 1173 - 1180, 2012.

REFERÊNCIAS

MARCHI, L.B.; MONTEIRO, A.R.G.; MIKCHA, J.M.G.; SANTOS, A.R.; CHINELLATO, M.M.; MARQUES, D.R.; DACOME, A.S.; COSTA, S.C. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of pomegranate peel extract (*Punica Granatum L.*) under different drying temperatures. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 44, p. 121 - 126, 2015.

MARTIN, K.R.; KRUEGER, C.G.; RODRIQUEZ, G.; DREHER, M.; REED, J.D. Development of a novel pomegranate standard and new method for the quantitative measurement of pomegranate polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, n. 1, p. 157 - 162, 2009.

MATEI, A.O.; GATEA, F.; TEODOR, E.D.; RADU, G.L. Tannins analysis from different medicinal plants extracts using MALDI-TOF and MEKC. **Chemical Papers**, v. 70, p. 515 - 522, 2016.

MEDINA, L.O.; VELOSO, C.A.; BORGES, E.A.; ISONI, C.A.; CALSOLARI, M.R.; CHAVES, M.M.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 193 - 197, 2007.

MEDJAKOVIC, S.; JUNGBAUER, A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. **Food & Function**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 19 - 39, 2013.

MEMENTO Fitoterápico Farmacopeia Brasileira, 1 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016, 114p.

MENA, P.; GARCÍA-VIGUERA, C.; NAVARRO-RICO, J.; MORENO, D.A.; BARTUAL, J.; SAURA, D.; MARTÍ, N. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 10, p. 1893 - 1906, 2012.

MERTENS-TALCOT, S.U.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; RIOS, J.; HINGORANI, L.; DERENDORF, H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 23, p. 8956 - 8961, 2006.

REFERÊNCIAS

MIDDHA, S.K.; USHA, T.; PANDE, V. HPLC Evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. **Advances in Pharmacological Sciences**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1 - 6, 2013.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; NITIRUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.148, n. 3, p. 901 - 908, 2013.

MOGHADDAM, G.; SHARIFZADEH, M.; HASSANZADEH, G.; KHANAVI, M.; DOLATSHAHI, F.; SADEGHI, N.; OVEISI, M.R.; HAJIMAHMOODI, M. Anti-ulcerative potential of *Punica granatum* L (Lythraceae) hydroalcohol fruit peel extract. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 13, n. 7, p. 1093 - 1097, 2014.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: WINYARD, P.G.; WILLOUGHBY, D.A. (Edt.). **Methods in Molecular Biology. Inflammation Protocols**. v. 225. New York: Humana Press. 2003. p. 115 - 121.

MORZELLE, Maressa Caldeira. **Resíduos de Romã (*Punica granatum*) na Prevenção da Doença de Alzheimer**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

MPHAHLELE, R.R.; FAWOLE, O.A.; MAKUNGA, N.P.; OPARA, U.L. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 143, p. 1 - 12, 2016.

MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, Reading, v. 122, n. 4, p. 987 - 996, 2010.

MUHACIR-GÜZEL, N.; TÜRKYILMAZ, M.; YEMIS, O.; TAGI, S.; OZKAN, M. Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. *Hicaznar*) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 933 - 940, 2014.

REFERÊNCIAS

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247 - 256, 2000.

NASCIMENTO, V.T.; LACERDA, E.U.; MELO, J.G.; LIMA, C.S.A.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 56 - 64, 2005.

NEGI, P.S.; JAYAPRAKASHA, G.K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 4, p. 1473 - 1477, 2003.

NUÑEZ-SÁNCHEZ, M.A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; MONEDERO-SAIZ, T.; GARCÍA-TALAVERA, N.V.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.B.; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C.; GARCÍA-ALBERT, A.M.; RODRÍGUEZ-GIL, F.J.; RUIZ-MARÍN, M.; PASTOR-QUIRANTE, F.A.; MARTÍNEZ-DÍAZ, F.; YÁÑEZ-GASCÓN, M.J.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 58, n. 6, p. 1199 - 1211, 2014.

ORAK, H.H.; YAGAR, H.; ISBILIR, S.S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. **Food Science and Biotechnology**, Seul, v. 21, n. 2, p. 373 - 387, 2012.

OUACHRIF, A.; KHALKI, H.; CHAIB, S.; MOUNTASSIR, M.; ABOUFATIMA, R.; FAROUK, L.; BENHARRAF, A.; CHAIT, A. Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 50, n. 4, p. 429 - 438, 2012.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; TEWTRAKUL, S.; YUENYONGSAWAD, S. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardized pomegranate rind extract. **Food Chemistry**, Reading, v. 123, n. 1, p. 400 - 403, 2010.

REFERÊNCIAS

PAUL, R.; GHOSH, U. Effect of thermal treatment on ascorbic acid content of pomegranate juice. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 11, n. 1, p. 309 - 313, 2012.

PHARMA ART Farmácia de Manipulação. Disponível em: <<http://www.pharmaart.com.br/pomegranate-350mg-60-caps-extrato-seco-de-rom.html>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

PHATTHALUNG, P.N.; CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2012, p. 1 - 8, 2012.

QUÍRON Farmácia – Manipulação e Homeopatia. Disponível em: < <http://www.farmaciaquiron.com.br/antioxidante>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

RAHIMI, H.R.; ARASTOO, M.; OSTAD, S.N. A Comprehensive review of *Punica granatum* (Pomegranate) properties intoxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 11, n. 2, p. 385 - 400, 2012.

RELVA VERDE Produtos Naturais. Disponível em: <http://www.lojarelvaverde.com.br/produto_info.php?id_produto=703> Acesso em: 12 jun. 2018.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, Reading, v. 130, n. 1, p. 214 - 221, 2012.

SAFFARZADEH-MATIN, S.; KHOSROSHAHI, F.M. Phenolic compounds extraction from Iranian pomegranate (*Punica granatum*) industrial waste applicable to pilot plant scale. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 583 - 597, 2017.

SANGEETHA, J.; VIJAYALAKSHMI, K. Physicochemical evaluation and chromatographic fingerprint profile of the rind of ganesh variety of *Punica granatum* Linn. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 3, n. 1, p. 329 - 337, 2012.

SANTIAGO, M.C.P.A.; GODOY, R.L.O.; BORGUINI, R.G.; PAIM, D.R.S.F.; SANTOS, L.F.C.; WILBERG, V.C.; NOGUEIRA, R.I.; FREITAS, S.P. Determinação de

REFERÊNCIAS

- punicalagina em Romã (*Punica granatum* L.) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Comunicado Técnico 204 – Embrapa**, Rio de Janeiro, v. 2014, n. 1, p. 1 - 4, 2014.
- SANTOS, B.S.; BARRETTO, L.C.O.; SANTOS, J.A.B.; SILVA, G.F. Obtention, freeze-drying and characterization of lemon grass (*Cymbopogon citratus* D.C.) and hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2013, Aracaju. **Anais...** Aracaju: SIMTEC, 2013. v. 1, n. 1, p. 366 - 375.
- SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. **Plant Polyphenols**, v. 59, p. 259 - 280, 1992.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21 - 40, 2001.
- SEDDON, T.J.; DOWNEY, M.O. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 14, n. 1, p. 54 - 61, 2008.
- SEERAM, N.P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam v. 348, n. 1-2, p. 63 - 68, 2004.
- SEERAM, N.; LEE, R.; HARDY, M.; HEBER, D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 49 - 55, 2005.
- SEERAM, N.P.; SCHULMAN, R.N.; HEBER, D. (Ed.). **Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine**. New York: Taylor & Francis Group, 2006.
- SEERAM, N.P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S.M.; FENG, L.; DREHER, M.; HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 4, p. 1415 - 1422, 2008.
- SENTANDREU, E.; CERDÁN-CALERO, M.; SENDRA, J.M. Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid

REFERÊNCIAS

chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 30, n. 1, p. 32 - 40, 2013.

SHIRODE, A.B.; BHARALI, D.J.; NALLANTHIGHAL, S.; COON, J.K.; MOUSA, S.A.; RELIENE, R. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, p. 475 - 484, 2015.

SILVA, M.P.; BORTONE, F.; SILVA, M.P.; ARAÚJO, T.R.; COSTA, M.S.; SILVA JÚNIOR, J.A. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by low level laser therapy in a rat paw edema model. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 1 - 7, 2011.

SILVA, R.M.F.; GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 103 - 109, 2012.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L. N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 124 - 128, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: Wiley Interscience, 1997. 765 p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25 - 35, 2005.

SREEKUMAR, S.; SITHUL, H.; MURALEEDHARAN, P.; AZEEZ, J.M.; SREEHARSHAN, S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1 - 12, 2014.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616 - 623, 2002.

REFERÊNCIAS

TP CLOT: reagentes para determinação manual ou automatizada do tempo de protrombina em plasma citratado. Responsável técnico: Gilmar Chizzolini Junior. Sorocaba: BIOS diagnóstica, 2014. Protocolo de kit para diagnóstico.

TTPA CLOT: reagentes para determinação manual ou automatizada do tempo de tromboplastina parcial ativada em plasma citratado (ativado pelo ácido elágico). Responsável técnico: Gilmar Chizzolini Junior. Sorocaba: BIOS diagnóstica, 2014. Protocolo de kit para diagnóstico.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Rockville:FDA, 1994. 33 p.

United States Pharmacopoeia (38th Edn.). The United States Pharmacopeial Convention: Rockville. 2015.

VORA, A.; LONDHE, V.; PANDITA, N. Herbosomes enhance the *in vivo* antioxidant activity and bioavailability of punicalagins from standardized pomegranate extract. **Journal of Functional Foods**, London, v. 12, p. 540 - 548, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Londres: Springer, 2009. 383 p.

WANG, C.; SHI, L.; FAN, L.; DING, Y.; ZHAO, S.; LIU, Y.; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 587 - 594, 2013.

WEBBER, V.; CARVALHO, S.M.; OGLIARI, P.J.; HAYASHI, L.; BARRETO, P.L.M. Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 4, p. 812 - 818, 2012.

WHO monographs on selected medicinal plants, v. 3. World Health Organization – WHO, 2009, p. 108 - 126.

WHO quality control methods for herbal materials. World Health Organization – WHO, 2011, 187.

REFERÊNCIAS

WILLIAMS, D.J.; EDWARDS, D.; PUN, S.; CHALIHA, M.; SULTANBAWA, Y. Profiling ellagic acid content: The importance of form and ascorbic acid levels. **Food Research International**, Ottawa, v. 66, n. 1, p. 100 - 106, 2014.

WU, S.; TIAN, L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, Basel, v. 22, n. 10, p. 1 - 17, 2017.

YAN, L.; YIN, P.; MA, C.; LIU, Y. Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Molecules**, Basel, v. 19, n. 11, p. 18923 - 18935, 2014.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Tratado de Hematologia*. 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013, 899p.

ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. **Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 703, n. 2, p. 99 - 107, 2010.

ZHANG, Y.; WANG, D.; LEE, R.P.; HENNING, S.M.; HEBER, D. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 16, p. 7395 - 7400, 2009.

ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, Y.; NAIDONG, W. Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, Oak Park, v.1, n. 1, p. 3 - 14, 2005.

ZHOU, B.; WU, Z.; LI, X.; ZHANG, J.; HU, X. Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by Capillary Electrophoresis and High-performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 19, n. 1, p. 86 - 89, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo submetido à *Current Analytical Chemistry*.Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Journal Name, Year, Volume

1

Miniaturized spectrophotometric method for quantification of tannins in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel dried extracts.Juliana Machado Brêtas^a, Diego Beltrão Pereira^a, Isabela Costa César^{*a}, Gerson Antônio Pianetti^a^aDepartment of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil**Structured Abstract:**

Background – *Punica granatum* L. (pomegranate) is one of the oldest edible fruits used for treatment of countless diseases. The bioactivity of this fruit is mainly related to tannins, especially ellagitannins. *P. granatum* fruit peel dried extracts (PPDEs) are widely marketed today and the lack of accessible quality control methods is a key to the variable and questionable quality of these products.

Objective – To develop a miniaturized spectrophotometric method for quantification of tannins in commercial PPDEs.

Method – Spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent was developed and validated for quantification of total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder in 17 samples of commercial PPDEs. Tannins content was calculated by the difference between total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder contents and expressed as pyrogallol. The UV/Visible microplate spectrophotometer was operated at 760 nm.

Results – The developed miniaturized method was precise, accurate, selective and linear, and has no rotational or translational matrix effect. This method significantly reduced the cost of the analysis: 82.2% with reagents, 84.7% in electricity consumption, and 56.3% in the total analysis time. The wide variability in tannins contents in commercial PPDEs (<1% to 14.20%) shows the importance of quality control, ensuring the therapeutic effect and the safety of the extracts.

Conclusion – A miniaturized spectrophotometric method was successfully developed and fully validated, being appropriate for quantification of tannins of PPDEs in quality control routine analysis, as it showed to be a simple and cheaper method.

Keywords: *Punica granatum* L., Pomegranate, Commercial dried extracts, Green chemistry, Miniaturized spectrophotometric method, Quality control, Tannins.

1. INTRODUCTION

Over centuries, *Punica granatum* L., also known as pomegranate, have been used for treatment of countless diseases, as diarrhea and inflammation, besides protection against oxidative stress [1,2]. *Punica granatum* L. is one of the oldest edible fruits, and in the last years its use and economic importance were expanded, mainly because of dissemination of its use, facility to obtain the seeds juice and dried extracts of *Punica granatum* L. peels and the increasing number of therapeutic activities attributed to these products [1-4].

The use of dried extracts by industries and compounding pharmacies is extremely advantageous, since it allows the application in production of several pharmaceutical forms, such as capsules, sachets, ointments, creams, tablets and gels. In addition to the wider range of uses, withdrawing

liquids from the extracts greatly increases the stability of the chemical constituents and minimizes microbial growth, prolonging the viability of the material [5,6].

The main bioactive substances in *Punica granatum* L. fruit peel are polyphenols known as ellagitannins. Among them, punicalagin is the major constituent of *Punica granatum* L., being a typical constituent of this fruit [4]. Other ellagitannins present are punicalin, gallic acid and ellagic acid, present in low concentrations (less than 5%), but some increased content may be found due to the hydrolysis of more complex tannins, such as punicalagin, during processing and extraction steps [4,7].

It is common to find commercial *Punica granatum* L. fruit peel dried extracts (PPDEs) with different characteristics from the pure extracts. These extracts have been marketed in compounding pharmacies, online pharmacies or even in physical or virtual natural products stores. Physical characteristics, such as color, and phytochemical characteristics, such as tannins content, are extremely variable, which is a problem for standardization and quality control of these products [8-10].

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil; Tel: +55-31-3409-6958; fax: +55-31-3409-6976; E-mail: isacesar@gmail.com.

Many methods applying different techniques focusing in tannins quantification on natural products may be found [11]. Some examples are colorimetric/spectrophotometric, gravimetric and turbidimetric methods; assays based on precipitation, enzyme activity changes or inhibition of microbial growth, methods using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS (MALDI-TOF), fast-atom bombardment MS (FAB-MS), HPLC with various detection methods (UV, DAD, MS, NMR, electrochemical, fluorescence, chemical hydrolysis), micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and capillary zone electrophoresis (CZE) [12-17]. However, colorimetric methods, which uses Folin-Ciocalteu reagent to quantify polyphenols, are preconized by official references, such as Brazilian Pharmacopoeia [18], European Pharmacopoeia [19] and United States Pharmacopoeia [20]. These methods are based on oxy-reduction reactions with formation of blue colored complex with maximum absorption in the region of visible spectrum [11,21].

Several methods are described in the literature for quantification of total tannins in natural products derived from *Punica granatum* L., such as, colorimetric/spectrophotometric and titrimetric assays [6, 22-29] and methods using HPLC with UV or MS detection [30-34].

Considering that most natural product traders are compounding pharmacies and small phytotherapeutic industries, the development of new and simple methods for tannins quantification in natural extracts, which may be easily applied without the requirement of highly qualified operators, expensive equipment or reagents is desirable and important. All these characteristics reduce the cost of the method, facilitating the suitability for application in quality control routine analysis. Thus, the aim of this work was to develop and validate a miniaturized spectrophotometric method for quantification of tannins in PPDEs, involving small reagent consumption and low analysis time. The

validated method was successfully applied for the analysis of 17 commercial samples of PPDEs.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

2.1.1. Apparatus

Analytical Balance BP211 D (Sartorius, Germany), Lyophilisator K105 (Liotop, Brazil), HandyStep® Electronic (Brand®, Germany), Microplate Reader VersaMax™ (Molecular Devices, USA), Sample Concentrator TecVap TE-0194 (TECNAL®, Brazil), Shaker KS 260 Control (IKA®, Germany), UV Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu, Brazil), Water Purification System Direct-Q® (Millipore, USA).

2.1.2. Chemicals

Analytical grade ethanol, Folin-Ciocalteu phenol reagent, hide powder and anhydrous sodium carbonate were purchased from Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brazil). Reference standards for ellagic acid (95.6%) and pyrogallol were from ChromaDex™ (Irvine, CA, USA) and from Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brazil), respectively. Ultra-pure water was prepared from a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.1.3. Commercial *Punica granatum* L. fruit peel dried extracts

Seventeen commercial PPDEs and one ellagic acid active pharmaceutical ingredient were obtained through donation from compounding pharmacies and phytochemical industries worldwide along with a copy of the manufacturer's report. The names of donators and producers were hidden, and the active pharmaceutical ingredient/PPDEs were identified by serial numbering (Table I and Fig. 1).



Fig. (1). Color and macroscopic appearance of ellagic acid active pharmaceutical ingredient (1), commercial PPDEs (2 to 18), PPDE control (19) and ellagic acid and punicalagin reference standards.

API: active pharmaceutical ingredient - EA: Ellagic acid - PPDE: *Punica granatum* L. fruit peel dried extract - PN: Punicalagin

Table 1. Classification of active pharmaceutical ingredient/PPDEs according to ellagic acid or total tannins contents declared in the reports and main labeling information provided by manufacturers/distributors.

PPDE	Extraction solvent	Drying Method	Vegetable Drug/Plant Derivative Ratio	Excipient
1 ^a	Methanol	-	30:1, w/w - 40:1, w/w	-
2 ^b	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
3 ^b	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
4	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
5	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
6 ^c	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
7 ^c	Water and ethanol	-	-	Maltodextrin ≤ 5%
8 ^d	-	-	-	-
9 ^d	-	-	-	-
10	Water and ethanol	-	-	-
11	Ethanol (90-100%) and water (0-10%)	-	4:1, w/w - 7:1, w/w (Dry peels:dry extract)	Maltodextrin; silicon dioxide; anti-caking agent
12	-	Spray-dryer	-	Maltodextrin
13	-	-	-	-
14 ^e	Water and ethanol	Spray-dryer	1:1, w/w	Maltodextrin
15 ^e	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17 ^f	-	-	-	Starch
18 ^f	-	-	-	Maltodextrin
19 ^g	Water and ethanol (10:90, v/v)	Lyophilization	3:1, w/w (Peel powder: lyophilized extract)	No excipients were used

^aEA APL 17-19 PPDEs from different pharmacies, but from the same manufacturing batch. ^bPPDEs manufactured by the same industry, but with different excipients. ^cPPDE 17 with starch and ^dPPDE 18 with maltodextrin. The award was not made available. ^ePPDE control. ^fAPL active pharmaceutical ingredients - EA: Ellagic acid - PPDE: *Punica granatum* L. fruit peel dried extract.

2.1.4. Preparation of *Punica granatum* L. fruit peel extract control

Considering the wide range of tannins contents and the different physical characteristics (color and flavor) of the commercial PPDEs, one extract was produced at *Faculdade de Farmácia of Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG* (Brazil) under controlled conditions as a comparison pattern (PPDE 19). The extract was produced from fruit peels from a *Punica granatum* L. tree of the Botanic Garden of the Zoo-Botanic Foundation of Belo Horizonte, Brazil (FZB-BH). The species (*Punica granatum* L. - Lythraceae) was authenticated, and deposited in the FZB-BH Herbarium: *BHZZB 11.145, Collector: Ordoñez, J. 2261*.

After optimization, the procedure consisted in cleaning the fruits with 0.03% sodium hypochlorite solution for 15 min and washing exhaustively with distilled water. The peels were manually separated, cut into small pieces and dried in laboratory oven at 35°C. Once dried, the peels were pulverized on a microprocessor and the powder (50 g) were mixed with the extraction solution (500 mL of absolute ethanol:ultrapure water (90:10, v/v)) under constant shaking and protect from light at room temperature (25 ± 3°C) for 48 hours. After complete decantation, the solution was filtered under vacuum on regenerated cellulose membrane of 0.45 µm. The extraction process was repeated 2 times with the residue and the fractions were pooled and concentrated in a sample concentrator under a stream of compressed air until residue (approximately 19 mL). This residue was fractionated in glass vials with rubber stopper (3 mL per vial) and frozen in liquid nitrogen for lyophilization for 48 h.

2.2. Sample preparation

All test and reference solutions were prepared using ultrapure water as solvent. Stock solutions consisted in

solubilizing accurately weighed 6.0 mg of PPDEs in volumetric flasks (25 mL) and filtrating using 0.45 µm regenerated cellulose filter. These solutions were used to prepare two other solutions: total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder. Tannins content was calculated by the difference between total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder contents and expressed as pyrogallol, by means of the equation of calibration curve.

2.2.1. Total polyphenols

An aliquot of the stock solutions (160 µL), of Folin-Ciocalteu (320 µL), of ultrapure water (560 µL) and of 29% aqueous sodium carbonate solution (960 µL) were added at microtubes in this order and vortexed for 30 sec. Then, the solutions were kept protected from light for 30 min. Ten minutes before the time ends, 200 µL of each solution were transferred to 96-well microplates and, once completed the reaction time, the absorbance was determined at 760 nm.

2.2.2. Polyphenols not adsorbed by hide powder

For polyphenols not adsorbed by hide powder a pre-treatment was necessary, which consisted in adding the stock solutions (10.0 mL) to hide powder (0.10 g) and vigorously shake for 60 min. Then, the solution was filtered using 0.45 µm regenerated cellulose filter and the filtrate (480 µL) were mixed with Folin-Ciocalteu (320 µL), ultrapure water (240 µL) and 29% aqueous sodium carbonate solution (960 µL) to the same final volume obtained for total polyphenols solution (2 mL). Then, the same procedure described for total polyphenols was performed. It was necessary a higher aliquot of the adsorbed solution due to the lower concentration of polyphenols after the adsorption.

2.3. Analytical method development

Several monographs of natural compounds published in pharmacopoeias were used as starting point for method development. Although some steps from the analytical procedure were basically identical to the pharmacopoeial methods, such as, reaction time and wavelength, other conditions needed to be adjusted to fit the purpose of this study (miniaturize the method) and the characteristics of the samples under analysis and the equipment used. Thus, the main parameters optimized during the method development were the concentration range of test solutions and the volumes of all used solutions (samples and reagents). These definitions were made based on the sensitivity of the method and on range of tannins contents present in PPDEs.

2.4. Analytical method validation

Validation of developed method was performed according to recommendations of the current regulatory guidelines in Brazil for the validation of analytical and bioanalytical methods used for quantitative analysis of phytotherapies: Normative Instruction IN n° 4 [35] and Resolutions RDC n° 27 [36] and RDC n° 166 [37] from ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária from Brazil).

2.4.1. Linearity and limits of detection and quantitation

The linearity was evaluated by a calibration curve prepared using seven concentrations of pyrogallol (0.19, 1.37, 2.55, 3.71, 5.00, 6.29 and 7.67 µg/mL), in triplicate. Stock solution of pyrogallol (240 µg/mL) was prepared in water and diluted in the same solvent to obtain the seven solutions of the analytical curve. For that, 3.17, 22.83, 42.50, 61.83, 83.33, 104.83 and 127.83 µL of stock solution were transferred to microtubes. Then, Folin-Ciocalteu (320 µL) were added in each tube, followed by water up to 1040 µL. Lastly, 29% aqueous sodium carbonate solution (960 µL) were added and the same procedure described for total polyphenols was performed.

Curves were constructed by plotting the responses for analyte *versus* concentration. The outliers were identified by

$$\text{Recovery percentage (\%)} = \frac{(\text{Concentration}_{\text{sample with pyrogallol}} - \text{Concentration}_{\text{sample}})}{\text{Theoretical concentration}} \times 100 \quad (3)$$

$\text{Concentration}_{\text{sample with pyrogallol}}$: Concentration of pyrogallol determined for samples of PPDE 11 at 50% of the working concentration in which it was added pyrogallol at low, medium or high concentration.
 $\text{Concentration}_{\text{sample}}$: Concentration of pyrogallol determined for samples of PPDE 11 at 50% of the working concentration.
 $\text{Theoretical concentration}$: Theoretical concentration of pyrogallol at low, medium or high concentration.

2.4.3. Matrix effect and selectivity

The matrix effect was evaluated through the comparison of two calibration curves established in the same way as in linearity, with the same concentration levels and the same number of replicates. The first curve was composed of standard solutions containing pyrogallol and the second was constructed by adding known amounts of pyrogallol to PPDE 11 at 50% of the working concentration. After correcting the responses obtained for the samples containing pyrogallol (Equation 4) and confirming the linearity of the two curves, *F*-test (Fischer-Snedecor) was applied to evaluate the homoscedasticity of residuals. Then, Student's *t*-test was used to compare the slopes and the intercepts of

Jackknife test ($\alpha = 0.05$) and then statistical tests were used to check if the obtained data met the assumptions for the ordinary least squares method, according to a procedure developed by Souza and Junqueira [38]. The normality, homoscedasticity and independence of the residues were evaluated through the Ryan Joiner's, Modified Levene's and Durbin-Watson tests, respectively. Next, adequacy of the data to the linear model was checked verifying the regression significance and the linearity deviation using ANOVA. The statistical significance was set at 5%.

The limits of detection and quantitation were estimated based on the standard deviation of the intercepts and the mean slopes of three analytical curves (Equations 1 and 2).

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

LD: Limit of detection. LQ: Limit of quantitation. σ : Standard deviation of the intercepts. S : Mean slopes of three analytical curves

2.4.2. Precision and accuracy

Precision was measured in two levels. Repeatability (intra-batch precision) was evaluated using relative standard deviation (RSD) of six replicates at 100% of the working concentration (240 µg/mL of PPDE), prepared independently by the same analyst. The assay was performed with PPDE 11, the commercial extract with higher purity and total tannins concentration. Intermediate precision (inter-batch precision) was verified by means RSD of results obtained with six replicates prepared three times by different analysts on different days ($n = 18$).

Accuracy was evaluated by a standard addition method. Recovery (Equation 3) of pyrogallol added to a PPDE 11 solution at 50% of the working concentration (120 µg/mL) was determined at low, medium and high concentrations (0.19, 3.71 and 7.67 µg/mL of pyrogallol), in triplicate. The RSD for each concentration was also calculated.

the curves (statistical significance set at 5%). When $t_{\text{calculated}} < t_{\text{critical}}$, the slopes and intercepts of the two curves were considered equivalent, indicating that the matrix effect was not significant.

$$\text{Corrected response} = \text{Response}_{\text{sample with pyrogallol}} - \text{Response}_{\text{sample}} \quad (4)$$

$\text{Response}_{\text{sample with pyrogallol}}$: Response obtained for samples of PPDE 11 at 50% of the working concentration in which it was added pyrogallol at different concentrations. $\text{Concentration}_{\text{sample}}$: Response obtained for samples of PPDE 11 at 50% of the working concentration.

This procedure allows a reliable estimation of the matrix effect constant throughout the concentration range (translational matrix effect) and the matrix effect influenced by changes in the analyte concentration (rotational matrix effect). The evaluation of these two types of matrix effect is

essential to ensure that, during the application of the method for analysis of commercial PPDEs, samples with high concentrations of tannins will not be under- or overestimated due to the increase of the matrix effect [39].

2.4.4. Robustness

Robustness was evaluated considering reaction time and type of water. Two samples, one with ultrapure water and other with distilled water, were prepared in triplicate and the absorbance was determined after 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120, 180, 300 and 420 min. Variations in the absorbance value indicated a critical condition.

2.5. Active pharmaceutical ingredient/PPDEs analysis

Once validated, the method was considered proper to be applied for the quantification of tannins in the seventeen commercial PPDEs, PPDE control and ellagic acid active pharmaceutical ingredient. Stock solutions was prepared by dissolving accurately weighed 3.0 mg of each sample in ultrapure water (25 mL). The procedure followed was previously described in *Sample preparation* and samples were prepared and analyzed in triplicate. Total tannins contents were calculated for each sample and expressed as pyrogallol.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Sample preparation

The choice of the solvent used to prepare the PPDEs solutions was performed considering two main factors: (1) allow the solubilization of the dried extracts; and (2) avoid precipitation of sodium carbonate. The full solubilization of the dried extracts is essential to obtain accurate results, avoiding underestimating the concentration of total tannins in the samples. During the development of the miniaturized method, it was found that the PPDEs were fully solubilized with ultrapure water, so that this solvent was employed for the preparation of solutions. Organic solvents such as methanol and ethanol, such as hydroalcoholic solutions, lead to precipitation of sodium carbonate, which has limited solubility in these solvents but is soluble in pure water. This precipitation is extremely detrimental to analysis, since Folin Ciocateau reaction requires basic pH to occur. In addition, inaccurate absorbance values are obtained with turbid solutions of precipitated sodium carbonate.

3.2. Analytical method validation

3.2.1. Linearity and limits of detection and quantitation

After statistical analysis, the optimized method was considered linear in the evaluated range (0.19 to 7.67

$\mu\text{g/mL}$). No outlier was detected and the results obtained for the tests of normality, homoscedasticity and independency of residuals showed that the residuals are in agreement with all the least squares method assumptions, presenting random distribution. The regression was statistically significant and lack of adjustment to the linear model was not observed. The correlation coefficient was higher than 0.99, as required by RDC 166 [37]. Limits of detection and quantitation were estimated as 0.04 and 0.12 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

3.2.2. Precision and accuracy

All the RSD values were lower than 2.0%, confirming the intra-batch and inter-batch precision of the developed method (Table 2) [40]. The mean recovery percentages and the RSD values were within the specified limits, between 98.0 and 102.0% of the theoretical concentration, [40] demonstrating an adequate accuracy (Table 3).

Table 2. Mean total tannins contents and RSD values obtained in the analysis of intra-batch and inter-batch precision.

Sample	Intra-batch precision (n=6)	
	Mean total tannins content	RSD (%)
Batch 1	2.74 $\mu\text{g/mL}$ (14.27%)	1.50
Batch 2	2.71 $\mu\text{g/mL}$ (14.15%)	1.59
Batch 3	2.72 $\mu\text{g/mL}$ (14.17%)	1.36
Inter-batch precision (n=18)	2.72 $\mu\text{g/mL}$ (14.20%)	1.44

RSD: relative standard deviation.

Table 3. Mean recovery percentages and RSD values obtained in the analysis of accuracy.

Level	Mean recovery (%)	RSD (%)
Low (0.19 $\mu\text{g/mL}$)	99.25	0.46
Medium (3.71 $\mu\text{g/mL}$)	99.28	0.25
High (7.67 $\mu\text{g/mL}$)	99.06	0.12

RSD: relative standard deviation.

3.2.3. Matrix effect and selectivity

Student's *t*-test indicated that the vegetal matrix does not affect the slope and intercept of the curve (t_{slope} (0.30), $t_{\text{intercept}}$ (1.86) < t_{critical} (2.09)), demonstrating the absence of rotational and translational matrix effect. This indicates that the interfering matrix compounds had no significant influence on tannins detection and did not react with the analytes to produce new interfering compounds that may affects the slope and the intercept of the curve (Fig. 2). Thus, these results denote that the matrix does not affect precision, accuracy, robustness and overall reliability of the method throughout the concentration range. The absence of matrix effect also ensures that the method is selective since in the analysis of pyrogallol in the presence of matrix and potential interfering, these parameters were not altered.

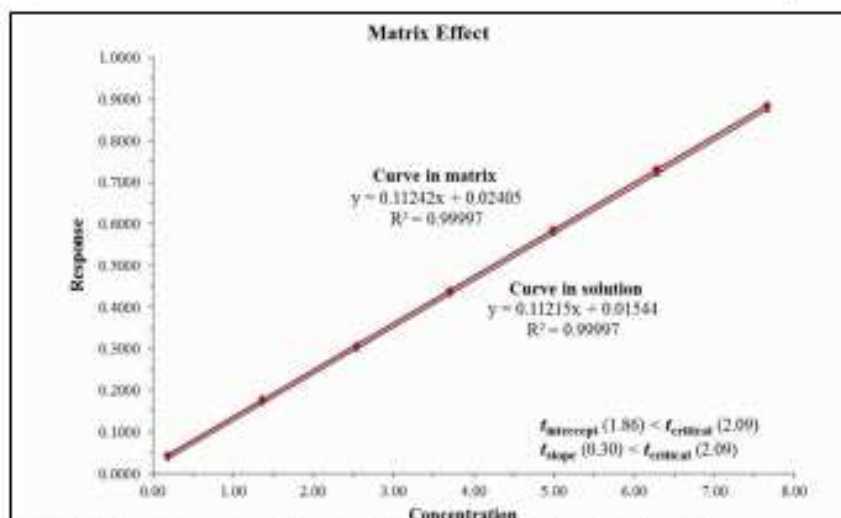


Fig. (2). Analytical curves in matrix and in solution obtained for the validated method.

3.2.4. Robustness

The ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test showed that the method was robust regarding the reaction time varying between 5 and 35 min. In this range, the absorbance was stable and the tannins content was not affected. However, the absorbance decreased after 35 min, leading to inaccurate results. Thus, it is important not to allow more than 35 min of reaction time. On the other hand, type of water was found to be a critical parameter for the reliability of the results, since statistical difference was observed in tannins content determined with ultrapure and distilled water. Therefore, the change of type of water should be avoided, aiming to assure the reliability of the method.

3.3. Cost comparison

The developed and validated miniaturized method was compared with the method preconized at Brazilian Pharmacopoeia 5th edition [18]. Although there is no method published for *Punica granatum* L. in this compendium, the standard procedure for other extracts was used, since the procedures are similar. It was observed that the developed method drastically reduced the cost of the analysis. Considering only the amount of reagents spent for the preparation of total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder solutions, the cost reduction was 82.2% (Table 4). In addition, the miniaturization promoted reduction in electricity consumption (84.7%) and in the total analysis time (56.3%).

Table 4. Cost comparison between the miniaturized validated method and the standard procedure described at Brazilian Pharmacopoeia 5th edition.

Reagent	Required amount		Price	Cost per sample	
	Brazilian Pharmacopoeia	Miniaturized method		Brazilian Pharmacopoeia	Miniaturized method
Water	60.00 mL	0.56 mL	0.03 USD/mL	1.50 USD	0.01 USD
Folin-Ciocalteu	2.00 mL	0.32 mL	0.48 USD/mL	0.96 USD	0.15 USD
Sodium carbonate	12.00 mL	0.96 mL	0.07 USD/mL	0.84 USD	0.07 USD
Hide powder	0.10 g	0.10 g	4.30 USD/g	0.43 USD	0.43 USD
Total cost with reagents				3.73 USD	0.66 USD
Reduction Percentage				82.2%	

The reduction of electricity consumption (84.7%) was determined using a simulator of the electricity company from Minas Gerais - Brazil. This simulator considers the power of each equipment in Watts and the time of use, to determine the electricity consumption in Kilowatt-hour. Thus, the consumption in Kilowatt-hour for the analysis of 96 samples by the method preconized at Brazilian Pharmacopoeia 5th edition [18] and by the miniaturized method was estimated, considering the operation of UV Spectrophotometer UV-1800 and Microplate Reader VersaMax™, respectively.

The reduction in the total time of analysis (56.3%) was calculated considering the time spent to analyze 96 samples,

from the beginning of the sample preparation, until the end of the absorbance measurement. As the sample preparation time is the same for both methods, the time required to measure the absorbance of the samples is the factor that effectively influences the reduction of the total analysis time.

The use of an UV/Visible microplate spectrophotometer allows the absorbance measurement of 96 samples simultaneously ensuring greater productivity in the laboratory. On the other hand, when a conventional spectrophotometer is employed, the bucket needs to be washed between every measurement, so that a longer time is required to complete the analysis. This makes the method

even more affordable and easy to implement in routine, especially for compounding pharmacies, which are the leading traders of PPDEs and other natural products.

Many colorimetric/spectrophotometric methods by Folin-Ciocalteu reaction previously described for determination of total polyphenols or total tannins employ high volumes of reagents, in the same way as the method preconized at Brazilian Pharmacopoeia 5th edition [18]. Regarding the time spent to perform the analysis, it is difficult to establish effective comparisons with these methods, since the time required for each analysis step is not always described. However, it is possible to verify a wide variation in the reaction time, ranging from 30 min, 1 h, 2 h, up to 6 h [22,24,27,29]. As previously verified in the robustness validation of the miniaturized method, reaction time is

determinant for the accuracy of the results. Very long times are harmful and may result in absorbance values lower than the real values.

Besides the great economic advantage, the environmental factor must be also considered. The miniaturized method consumes considerably less reagents and electricity, producing less chemical waste and contributing to the green chemistry, a current concern in analytical laboratories.

3.4. Active pharmaceutical ingredient/PPDEs analysis

The validated method was successfully applied to the quantification of tannins in seventeen commercial PPDEs, PPDE control and in the acquired ellagic acid active pharmaceutical ingredient (Table 5).

Table 5. Total tannins contents determined for the seventeen commercial PPDEs, PPDE control and ellagic acid active pharmaceutical ingredient, and main labeling information for comparison with the obtained results.

PPDE	Labeling information			Total tannins contents determined		
	Color	Total tannins (%)	EA (%)	µg/mL	%	RSD (%)
1 ^a	Grey	-	90.77	< LQ and > LD	< LQ and > LD	1.06
2 ^b	Grey	-	44.91	< LQ and > LD	< LQ and > LD	1.04
3 ^b	Grey	-	44.91	< LQ and > LD	< LQ and > LD	0.31
4	Light brown	-	44.06	< LQ and > LD	< LQ and > LD	0.47
5	Grey	-	40.86	0.69	3.58	1.16
6 ^c	Grey	-	40.84	< LQ and > LD	< LQ and > LD	0.98
7 ^c	Grey	-	40.84	< LD	< LD	0.03
8 ^d	Grey	-	40.80	< LQ and > LD	< LQ and > LD	0.38
9 ^d	Grey	-	40.80	< LQ and > LD	< LQ and > LD	0.42
10	Grey	-	40.70	< LQ and > LD	< LQ and > LD	1.26
11	Brown	-	15.50	2.72	14.20	0.74
12	Brown	9.37	-	0.62	3.26	0.44
13	Brown	9.37	-	0.69	3.57	0.46
14 ^e	Brown	7.04	-	0.62	3.25	0.35
15 ^e	Brown	7.04	-	0.68	3.55	0.26
16	Yellow	-	-	1.21	6.31	0.17
17 ^f	Yellow	-	-	1.19	6.19	0.11
18 ^f	Yellow	-	-	0.73	3.81	0.58
19 ^g	Brown	-	-	3.85	20.08	1.03

^aEA: API. ^{b-c}PPDEs from different pharmacies, but from the same manufacturing batch. ^dPPDEs manufactured by the same industry, but with different excipients. ^ePPDE 17 with starch and PPDE 18 with malbolonin. The steroid was not made available. ^fPPDE control. ^gAPI: active pharmaceutical ingredient - EA: Ellagic acid - LD: Limit of detection - LQ: Limit of quantitation - PPDE: *Passiflora granatense* L. fruit peel dried extract - RSD: relative standard deviation.

It is important to notice that total tannins contents of PPDEs is widely variable, evidencing the need for a method with a wide work range to provide a precise and accurate quantification. Other important point is that PPDE 19 (control extract), produced under controlled conditions and without any addition of ellagic acid or excipients, presented the highest amount of tannins (20.08%), which are responsible for the most of biological activities attributed to these extracts. Except for PPDE 11, which was the commercial PPDE with the highest amount of tannins (14.20%), all other extracts presented low tannins contents, which may indicate adulteration of the natural product or degradation of the tannins.

For samples 2-10, it was possible to establish a relation between declared content of ellagic acid higher than 40% and the absence of quantifiable tannins (< limit of quantitation) by the present method. For the four PPDEs (samples 12-15) with total tannins contents reported by the manufacturers (from 7.04 to 9.37%), the values determined

in this study were considerably lower (from 3.25 to 3.57%). This difference may be a consequence of inappropriate storage or transportation, leading to tannin degradation.

As can be seen in Tables 1 and 5 and in Figure 1, PPDEs presented different characteristics, production process and composition regarding ellagic acid or total tannins. Other interesting observation is the correlation between the observed contents and the colors of extracts, ellagic acid and punicalagin standards. Extracts 1 to 10 (except for PPDE 4), with high ellagic acid contents declared by manufacturers ($\geq 40\%$) and non-quantifiable tannins contents (< limit of quantitation), presented the same color of the ellagic acid reference standard. On the other hand, extracts 11 to 19, whose manufacturer's report indicated low ellagic acid or tannins contents (or no declared value), had a determined total tannins contents higher than the limit of quantitation, besides brown or yellow color, similar the color of the punicalagin standard (yellow). In addition, the color of these PPDEs is also similar to the color of PPDE control and of the

pericarp of *Punica granatum* L. fruit (yellow when *in natura* and brown when dry) [41]. This association of the total tannins contents with the color of punicalagin standard is significant, since punicalagin is a constituent almost exclusive to *Punica granatum* L., originally present in high concentration, and responsible for the therapeutic activities attributed to products derived from the fruit peel of this plant.

The analysis of the color of the PPDEs and its total tannins contents is extremely important to evaluate the quality of these products. This analysis is essential for the quality control of the PPDEs and allows verifying their integrity related to the preservation of natural phytochemical characteristics of the fruit peel of *Punica granatum* L., such as maintenance of high tannins contents and low ellagic acid content. Ellagic acid content in PPDEs obtained in suitable production processes is originally very low (3 to 5%) [42,43] and concentrations far above this level may be an indication of excessive hydrolysis of ellagitannins during fruit peel processing and extraction. Other considerable possibility is the adulteration with addition of synthetic ellagic acid, or ellagic acid extracted from other natural sources, or even addition of excessive amounts of excipients.

The high variability observed between the commercial PPDEs may be an indication of different biological responses, demonstrating the need for greater attention of the regulatory agencies for the standardization and control of phytotherapies, in order to keep and valorize the natural composition of the products.

CONCLUSION

A miniaturized spectrophotometric method was successfully developed and fully validated, being appropriate for quantification of tannins in PPDEs in quality control routine analysis, as it showed to be a simple and cheaper method. The method was successfully applied in the analysis of seventeen commercial PPDEs, an active pharmaceutical ingredient and a PPDE control produced at the *Faculdade de Farmácia of Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG* (Brazil) under controlled conditions as a comparison pattern. The results indicated a wide variability in the tannins contents, evidencing the importance of conducting quality control tests to evaluate commercially available products.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN/ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used for studies that are base of this research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* and *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais*

(FAPEMIG) for providing scholarship and funds for research.

REFERENCES

- [1] Lantzoarakí, D.Z.; Sinanoglou, V.J.; Zoumpoulakis, P.G.; Glamočlija, J.; Čirić, A.; Soković, M.; Heropoulos, G.; Poestos, C. Antiradical-antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *RSC Adv*, 2015, 5, 2602-2614.
- [2] Shirode, A.B.; Bharali, D.J.; Nallanthighal, S.; Coon, J.K.; Mousa, S.A.; Relene, R. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. *Int J Nanomed*, 2015, 10, 475-484.
- [3] Mansour, E.; Ben Khaled, A.; Lachiheb, B.; Abid, M.; Bachar, K.; Ferchichi, A. Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate. *J Agr Sci Tech*, 2013, 15(1), 1393-1403.
- [4] Vora, A.; Lonšhe, V.; Pandita, N. Herbosomes enhance the *in vivo* antioxidant activity and bioavailability of punicalagins from standardized pomegranate extract. *J Funct foods*, 2015, 12, 540-548.
- [5] Silva, R.M.F.; Gomes, T.C.B.L.; Albuquerque, M.M.; Silva Junior, J.O.C.; Barbosa, W.L.R.; Rolim Neto, P.J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. *Rev Bras Plantar Med*, 2012, 14(1), 103-109.
- [6] Mphahlele, R.R.; Fawole, O.A.; Makunga, N.P.; Opara, U.L. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16, 1-12.
- [7] Boege, G.; Crozier, A. HPLC-PDA-MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages. *Food Chem*, 2012, 135(1), 1863-1867.
- [8] Lansky, E.P. Beware of Pomegranates Bearing 40% Ellagic Acid. *J Med Food*, 2006, 9(1), 119-122.
- [9] Madrigal-Carballo, S.; Rodriguez, G.; Krueger, C.G.; Dreher, M.; Reed, J.D. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *J Funct foods*, 2009, 1(3), 324-329.
- [10] Zhang, Y.; Wang, D.; Lee, R.P.; Henning, S.M.; Heber, D. Absence of Pomegranate Ellagitannins in the Majority of Commercial Pomegranate Extracts: Implications for Standardization and Quality Control. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16), 7395-7400.
- [11] Scalbert, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *Plant Polyphenols*, 1992, 59, 259-280.
- [12] Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim Feed Sci Technol*, 2001, 91(1-2), 21-40.
- [13] Heil, M.; Baumann, B.; Andary, C.; Linsemair, K.E.; McKey, D. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*, 2002, 89(11), 519-524.
- [14] Amoim, E.L.C.; Nascimento, J.E.; Monteiro, J.M.; Sobrinho, T.J.S.P.; Araújo, T.A.S.; Albuquerque, U.P.A. A Simple and Accurate Procedure for the Determination of Tannin and Flavonoid Levels and Some Applications in Ethnobotany and Ethnopharmacology. *Funct Ecosyst Communities*, 2008, 2, 88-94.
- [15] Seddon, T.J.; Downey, M.O. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2008, 14(1), 54-61.
- [16] Lima, M.B.; Andrade, S.J.E.; Harding, D.P.; Pistonesi, M.F.; Band, B.S.F.; Araújo, M.C.U. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. *Talanta*, 2012, 88, 717-723.
- [17] Matei, A.O.; Gatea, F.; Teodor, E.D.; Radu, G.L. Tannins analysis from different medicinal plants extracts using MALDI-TOF and MEKC. *Chem Pap*, 2016, 70(4), 515-522.
- [18] Brazilian Pharmacopoeia (5th Edn.). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Brasília, 2010.
- [19] European Pharmacopoeia (9th Edn.). European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM): France, 2017.
- [20] United States Pharmacopoeia (38th Edn.). The United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2015.
- [21] DiCianla, M.C.; Lopes, G.C.; Scarmínio, I.S.; Mello, J.C.P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schizus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and

Short Running Title of the Article

Journal Name, 2014, Vol. 6, No. 6 9

- development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Quím Nova*, 2014, 37(1), 158-163.
- [22] Guo, S.; Deng, Q.; Xiao, J.; Xie, B.; Sun, Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing dna damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(8), 3134-3140.
- [23] Orak, H.H.; Yagar, H.; Isbilir, S.S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum L.*) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21(2), 373-387.
- [24] Bekir, J.; Mars, M.; Souchard, J.P.; Bouajila, J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55, 470-475.
- [25] Dewi, M.A.; Ratnawati, J.; Purwasih, R.W. Determination of total tannin of white and red rind pomegranate (*Punica granatum L.*) by colorimetry method using reagent 1, 10 phenantroline. *Procedia Chem*, 2014, 13, 214-217.
- [26] Abid, M.; Yaich, H.; Cheikhrouhou, S.; Khemakhem, I.; Bouaziz, M.; Attia, H.; Ayad, M.A. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *J Food Sci Technol*, 2017, 54(9), 2890-2901.
- [27] Amri, Z.; Zaouay, F.; Lazreg-Aref, H.; Soltana, H.; Mneri, A.; Mars, M.; Hammami, M. Phytochemical content, Fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: Comparison between edible and non edible varieties grown in Tunisia. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104, 274-280.
- [28] Fernandes, L.; Pereira, J.A.; López-Cortés, I.; Salazar, D.M.; González-Álvarez, J.; Ramalhosa, E. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. *Eur Food Res Technol*, 2017, 263(10), 1799-1814.
- [29] Saffarzadeh-Matin, S.; Khosrowshahi, F.M. Phenolic compounds extraction from Iranian pomegranate (*Punica granatum*) industrial waste applicable to pilot plant scale. *Ind Crops & Prod*, 2017, 108, 583-597.
- [30] Fischer, U.A.; Jaksch, A.V.; Carle, R.; Kammerer, D.R. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruits and juices. *Eur Food Res Technol*, 2013, 237(2), 209-221.
- [31] Galego, L.R.; Jockusch, S.; Da Silva, J.P. Polyphenol and volatile profiles of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit extracts and liquors. *Int J Food Sci Technol*, 2013, 48(4), 693-700.
- [32] Gómez-Caravaca, A.M.; Verrado, V.; Toselli, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Caboni, M.F. Determination of the Major Phenolic Compounds in Pomegranate Juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(22), 5328-5337.
- [33] Muhacir-Güzel, N.; Türkyılmaz, M.; Yemis, O.; Tağı, S.; Ozkan, M. Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum L.*, cv. *Hicaznar*) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, 2014, 59(2), 933-940.
- [34] Brighenti, V.; Grothuis, S.F.; Principe, F.P.; Amir, R.; Benvenuti, S.; Pellati, F. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum L.* (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*, 2017, 1480, 20-31.
- [35] ANVISA. IN 4, Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. 2014.
- [36] ANVISA. RDC 27, Validação de métodos bioanalíticos. 2012.
- [37] ANVISA. RDC 166, Validação de métodos analíticos. 2017.
- [38] Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. *Anal Chim Acta*, 2005, 552(1-2), 25-35.
- [39] Brêtas, J.M.; César, I.C.; Brêtas, C.M.; Teixeira, L.S.; Bellorio, K.B.; Mundim, I.M.; Pianetti, G.A. Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of naproxen and sumatriptan in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *Anal Biomol Chem*, 2016, 408(15), 3981-3992.
- [40] Green, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem*, 1996, 68, 305-309.
- [41] WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization: Geneva 2009, 3, 108-126.
- [42] Mertens-Talcot, S.U.; Films-Stohlawetz, P.; Rios, J.; Hingorani, L.; Derendorf, H. Absorption, Metabolism, and Antioxidant Effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after Ingestion of a Standardized Extract in Healthy Human Volunteers. *J Agric Food Chem*, 2009, 54(23), 8956-8961.
- [43] Martin, K.R.; Krueger, C.G.; Rodríguez, G.; Dreher, M.; Reed, J.D. Development of a novel pomegranate standard and new method for the quantitative measurement of pomegranate polyphenols. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(1), 157-162.

Received:

Revised:

Accepted:

APÊNDICE B – Resumo enviado ao VI ABCF Congress.**MINIATURIZED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTIFICATION OF TANNINS IN POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) FRUIT PEEL DRIED EXTRACTS.**

Id Trabalho: 403

Autores: JULIANA MACHADO BRÊTAS ¹, DIEGO BELTRÃO PEREIRA ¹, ISABELA DA COSTA CÉSAR ¹, GERSON ANTÔNIO PIANETTI ¹

Instituição: ¹ FAFAR-UFMG - FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Campus UFMG)

Resumen:

Introduction – *Punica granatum* L. (pomegranate) is one of the oldest edible fruits used for treatment of countless diseases. The bioactivity of this fruit is mainly related to tannins, especially elagitannins. *Punica granatum* L. fruit peel dried extracts (PPDEs) are widely marketed today and the lack of accessible quality control methods is a key to the variable and questionable quality of these products. To develop a miniaturized spectrophotometric method for quantification of tannins in commercial PPDEs.

Methods – Spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent was developed and validated for quantification of total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder in 17 samples of commercial PPDEs. Tannins content was calculated by the difference between total polyphenols and polyphenols not adsorbed by hide powder contents and expressed as pyrogallol. The UV/Visible microplate spectrophotometer was operated at 760 nm.

Results and Discussion – The developed miniaturized method was precise, accurate, selective and linear, and has no rotational or translational matrix effect. This method significantly reduced the cost of the analysis: 82.2% with reagents, 84.7% in electricity consumption, and 56.3% in the total analysis time. The wide variability in tannins contents in commercial PPDEs (<1% to 14.20%) shows the importance of quality control, ensuring the therapeutic effect and the safety of the extracts.

Conclusions – A miniaturized spectrophotometric method was successfully developed and fully validated, being appropriate for quantification of tannins of PPDEs in quality control routine analysis, as it showed to be a simple and cheaper method.

Keywords:

Punica granatum L. Pomegranate. Commercial dried extracts. Tannins. Pyrogallol. Miniaturized spectrophotometric method. Quality control. Green chemistry.

APÊNDICE C – Resumo enviado a XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.



XXV
JORNADAS



DE JÓVENES
INVESTIGADORES
ENCARNACION - PARAGUAY



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE ITAPÚA

11. Produtos Naturais Bioativos e suas aplicações

Extratos secos da casca do fruto de romã (*Punica granatum* L.). Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina por CLAE-UV e avaliação da atividade antibacteriana e do potencial antioxidante.

Beltrão Pereira, Diego; da Costa César, Isabela³; de Paula Sabino, Adriano³; Fernandes Mota, Bruno Eduardo; Machado Brêtas, Juliana¹; Pianetti, Gerson Antônio²; Sá Magalhães Serafim, Mateus.
¹Pesquisador Principal e Representante do Trabalho; ²Orientador; ³Coorientador.

Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo

A *Punica granatum* L., popularmente conhecida como romã ou pomegranate, é consolidada na medicina tradicional e seu uso vem crescendo nos últimos anos, devido ao maior conhecimento das propriedades terapêuticas e à facilidade de aquisição de derivados, como o extrato seco da casca do fruto (ESF). A parte mais utilizada na terapêutica é o pericarpo, o qual é rico em compostos fenólicos, como a punicalagina (PN) e o ácido elágico (AE). A determinação do teor de PN e AE em ESFs é fundamental para o controle da qualidade dos mesmos, assegurando a autenticidade e a ausência de adulterações por adição de AE ou de outras substâncias. Desse modo, objetivou-se realizar o controle de qualidade físico-químico e biológico de ESFs comerciais por meio do doseamento de AE e PN e da avaliação da atividade antibacteriana e do potencial antioxidante. Um método analítico por CLAE-UV foi desenvolvido, validado e aplicado na quantificação de AE e PN nos ESFs. Os teores obtidos foram divergentes, havendo muitos extratos com AE acima do valor esperado e PN muito abaixo, sendo esse fato, um forte indício de adulteração. Na avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e do potencial antioxidante, os resultados evidenciaram o impacto negativo que o excesso de um componente no ESF pode ter sobre as respostas biológicas, pois ESFs com altos teores de AE forneceram respostas negativas. Já os ESFs mais puros, com maior teor de PN, tiveram atividade antibacteriana significativa contra *S. aureus* e *S. pyogenes* e potencial antioxidante próximo ao do ácido ascórbico. Desse modo, o trabalho evidencia a importância do controle de qualidade físico-químico e biológico de ESFs, possuindo grande importância para o meio científico, indústrias, farmácias de manipulação e para a população.

Palavras-Chave: *Punica granatum* L., Ácido elágico, Punicalagina, Antibacteriano, Antioxidante.

APÊNDICE D – Resumo enviado ao XII Congresso Mundial de Farmacêuticos da Língua Portuguesa.

Área 2 - PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

AVALIAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO E PUNICALAGINA EM EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE PUNICA GRANATUM

JULIANA MACHADO BRÊTAS; DIEGO BELTRÃO PEREIRA; ISABELA DA COSTA CÉSAR; NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS; GÉRSO ANTONIO PLANETTI

DEPARTAMENTO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS, FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, BELO HORIZONTE (MG), BRASIL

jubretas@gmail.com

Introdução: A *Punica granatum*, conhecida no Brasil como romã, é originária da Ásia e difundida pelo mundo, havendo registro do seu uso na medicina popular desde o Antigo Egito. O uso terapêutico *in natura* ou em fitoterápicos vem crescendo, sendo a casca do fruto e o mesocarpo as partes mais utilizadas, devido à elevada concentração de taninos, como a punicalagina (PN) e o ácido elágico (AE). Essas substâncias estão relacionadas às atividades biológicas atribuídas aos extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum*, amplamente comercializados atualmente. Determinar o teor desses marcadores em extratos comerciais, a partir de uma técnica confiável, é fundamental para assegurar a qualidade e a pureza dos extratos, sendo esse o objetivo do trabalho. **Metodologia:** Um método por CLAE para quantificação de AE e PN em extratos secos foi desenvolvido e validado de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA. O método foi aplicado na análise de 17 extratos comerciais de *Punica granatum*. **Resultados:** Utilizando um sistema cromatográfico Thermo Scientific com detector PDA Plus, foram injetados 5µL das amostras mantidas a 5°C. A separação foi realizada utilizando coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100mm×4,6mm, 5µm) a 35°C e fase móvel constituída de ácido fórmico e metanol (55:45,w/v) pH 3,50 com fluxo de 1mL/min. O tempo de corrida foi de 6,50 minutos e a detecção realizada a 375nm. A faixa de trabalho validada foi de 2,00%–120,00%. O método foi aprovado em todos os parâmetros de validação preconizados, sendo considerado preciso, exato, linear e seletivo. Os teores dos marcadores variaram amplamente entre os extratos analisados: 4,14%–75,54% para AE e 3,53%–13,36% para PN. **Conclusão:** Foi possível identificar uma diferença significativa na constituição dos extratos comerciais, a qual pode estar relacionada aos modos de produção ou a adulteração por adição de AE aos extratos. Isso pode reduzir a atividade terapêutica e aumentar a toxicidade, impactando na saúde do paciente. Com isso, esse trabalho evidencia a importância do controle de qualidade na produção e comercialização dos extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum*. **Palavras-chave:** ácido elágico; punicalagina; *Punica granatum*.

Não houve auxílio ou bolsa de estudos para a realização do respectivo trabalho.

APÊNDICE E – Resumo enviado ao III Simpósio de Microbiologia da UFMG.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ EM BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

Serafim, M.S.M.¹; Brêtas, J.M.²; César, I.C.²; Mota, B.E.F.¹

¹Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG.

²Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG.


E-mail: tsa_mateus@hotmail.com

A *Punica granatum*, popularmente conhecida no Brasil como romã, é usada há séculos com diversas finalidades terapêuticas, dentre elas a ação antibacteriana, como no tratamento de infecções de garganta, placa dentária e diarreia. Dentre suas diversas atividades biológicas, a atividade antibacteriana se deve aos taninos presentes na casca do fruto, como o ácido elágico (AE) e a punicalagina (PN). Sabe-se que o extrato seco da casca de romã possui atividade contra algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, além de alguns cocos Gram positivos, como o *Staphylococcus aureus*. Visando assegurar que esses extratos comercializados em farmácias magistrais de Belo Horizonte possuem essa atividade biológica, este trabalho buscou avaliá-la em 18 extratos, além dos taninos isolados, AE e PN. Foi realizado um ensaio de microdiluição em caldo onde 100µL de uma suspensão bacteriana (10⁵ UFC/mL) foi adicionada aos poços contendo 100µL das soluções dos extratos diluídos em caldo (600µg/mL). Após incubação a 37°C por 24h, a ausência de crescimento visual (turbidez do meio) foi considerada como um “hit”, partindo-se para avaliações da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM respectivamente). Além destes, realizou-se um teste de difusão em ágar por poço. Dentre os extratos testados, sete deles (denominados 11, 12, 13, 15, 16, 17 e 18), além da PN, apresentaram relevante atividade contra as bactérias Gram positivas (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*), com os testes de CIM e CBM mostrando valores entre 37,5 e 600µg/mL, não apresentando atividade contra Gram negativas. No teste de difusão em ágar obtiveram-se halos de inibição proporcionais aos valores de CIM. Embora se conheça a atividade biológica dos extratos, dentre aqueles avaliados, apenas sete apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas e, somente em bactérias Gram positivas, enfatizando a importância do controle de qualidade na cadeia produtiva destes fitoterápicos.


Palavras chave: Extratos de romã, Antibacteriano, Gram positivas, CIM, CBM, Difusão em ágar

Apoio financeiro: CNPq

APÊNDICE F – Resumo enviado a XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG.



**Semana
Conhecimento** UFMG
2016
Cultivar Vidas: Ciência e Sociedade



XXV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ EM BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

AUTORES
MATEUS SA MAGALHAES SERAFIM
BRUNO EDUARDO FERNANDES MOTA
JULIANA MACHADO BRÊTAS
ISABELA COSTA CÉSAR
BRUNO EDUARDO FERNANDES MOTA
GERSON ANTÔNIO PIANETTI

RESUMO
A PUNICA GRANATUM, POPULARMENTE CONHECIDA NO BRASIL COMO ROMÃ, É USADA HÁ SÉCULOS COM DIVERSAS FINALIDADES TERAPÊUTICAS, DENTRE ELAS A AÇÃO ANTIBACTERIANA, COMO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES DE GARGANTA, PLACA DENTÁRIA E DIARREIA. DENTRE SUAS DIVERSAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS, A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SE DEVE AOS TANINOS PRESENTES NA CASCA DO FRUTO, COMO O ÁCIDO ELÁGICO (AE) E A PUNICALAGINA (PN). SABE-SE QUE O EXTRATO SECO DA CASCA DE ROMÃ POSSUI ATIVIDADE CONTRA ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE, ALÉM DE ALGUNS COCOS GRAM POSITIVOS, COMO O STAPHYLOCOCCUS AUREUS. VISANDO ASSEGURAR QUE EXTRATOS COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS MAGISTRAIS DE BELO HORIZONTE POSSUEM ESSA ATIVIDADE BIOLÓGICA, ESTE TRABALHO BUSCOU AVALIAR EM 18 EXTRATOS, ALÉM DOS TANINOS ISOLADOS, AE E PN. FOI REALIZADO UM ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO ONDE 100ML DE UMA SUSPENSÃO BACTERIANA (105 UFC/ML) FOI ADICIONADA AOS POÇOS CONTENDO 100ML DAS SOLUÇÕES DOS EXTRATOS DILUÍDOS EM CALDO (600MG/ML). APÓS INCUBAÇÃO A 37°C POR 24H, A AUSÊNCIA DE CRESCIMENTO VISUAL (TURBIDEZ DO MEIO) FOI CONSIDERADA COMO UM "HIT", PARTINDO-SE PARA AVALIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA (CIM E CBM RESPECTIVAMENTE). ALÉM DESTES, REALIZOU-SE UM TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR POÇO. DENTRE OS EXTRATOS TESTADOS, SETE DELES (DENOMINADOS 11, 12, 13, 15, 16, 17 E 18), ALÉM DA PN, APRESENTARAM RELEVANTE ATIVIDADE CONTRA AS BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS (S. AUREUS, ENTEROCOCCUS FAECALIS E STREPTOCOCCUS PYOGENES), COM OS TESTES DE CIM E CBM MOSTRANDO VALORES ENTRE 75 E 600MG/ML, NÃO APRESENTANDO ATIVIDADE CONTRA GRAM NEGATIVAS. NO TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR OBTIVERAM-SE HALOS DE INIBIÇÃO PROPORCIONAIS AOS VALORES DE CIM. EMBORA SE CONHEÇA A ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, DENTRE AQUELES AVALIADOS, APENAS SETE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS E, SOMENTE EM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS, ENFATIZANDO A IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE NA CADEIA PRODUTIVA DESTES FITOTERÁPICOS.

PALAVRAS-CHAVE: EXTRATOS DE ROMÃ, ANTIBACTERIANO, GRAM POSITIVAS, CIM, CBM, DIFUSÃO EM ÁGAR.

APÊNDICE G – Resumo enviado ao Congresso Nacional dos Farmacêuticos de 2015. Evento organizado pela Ordem dos Farmacêuticos de Portugal.

			
RESUMO DO POSTER			
REFERÊNCIA (reservado aos serviços)			
ÁREA PROFISSIONAL (de 01 a 10)		03	
TÍTULO			
Identificação e avaliação das atividades antitumoral e hemostática de extratos secos da casca de romã utilizando ácido elágico e punicalagina como marcadores ativos.			
RESUMO			
<p>A <i>Punica granatum</i> L., conhecida no Brasil como romã, é originária da Ásia, sendo cultivada em diversas regiões subtropicais. A parte mais utilizada na terapêutica é a casca do fruto e o mesocarpo, onde estão concentrados taninos hidrolisáveis, como a punicalagina (PNG) e o ácido elágico (AE). Além das diversas atividades biológicas atribuídas ao extrato seco da casca de romã, há registros científicos de que os taninos possuem atividade antitumoral. A identificação de taninos característicos da romã, como a PNG, é fundamental para o controle de qualidade de fitoterápicos, assegurando que não houve adulteração do extrato. Diante disso, desenvolveu-se um método por cromatografia em camada delgada para identificação de AE e PNG, permitindo a análise de forma barata e rápida da composição dos 19 extratos obtidos por doação, viabilizando sua utilização em farmácias magistrais e indústrias de pequeno porte. Além disso, a identidade de 4 extratos, sendo cada um representante de uma faixa de concentração de AE, foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi verificada uma grande diferença entre os perfis cromatográficos dos extratos. Após a etapa de identificação foram feitos dois testes: avaliação preliminar da atividade antitumoral de 4 extratos e dos padrões de AE e PNG e a avaliação da atividade hemostática dos 19 extratos adquiridos. A atividade antitumoral foi verificada através do ensaio de redução do MTT, utilizando linhagem celular humana de carcinoma de cólon retal (RKO-AS45-1), e a avaliação da atividade hemostática <i>in vitro</i> foi realizada mensurando os tempos de protrobina e de tromboplastina parcial ativada. Tanto os padrões quanto os extratos, em suas concentrações plasmáticas máximas, calculadas considerando a dose média diária recomendada, não impactaram significativamente sobre a hemostasia. No teste da atividade antitumoral, os padrões de AE e PNG foram eficazes contra a linhagem testada, apresentando IC₅₀ de 21,50 µg/mL ± 0,78 e 20,84 µg/mL ± 2,84, respectivamente. Entretanto, a atividade citotóxica dos extratos avaliados não foi tão significativa (IC₅₀ médio de 196,16 µg/mL). Embora a causa dessa discrepância ainda esteja sob investigação, estando em andamento o estudo em outras linhagens de células neoplásicas (MDA-MB-231, MCF7 e TOV-21G), fica evidente a importância da realização de estudos científicos para a confirmação das indicações "off label" de uso dos extratos secos de romã, garantindo a segurança dos pacientes.</p>			
Solicita-se o envio até dia 14 de Setembro de 2015 para: congresso@ordemfarmaceuticos.pt (A Ficha de Identificação deverá ser submetida conjuntamente com o Resumo).			
Rua da Sociedade Farmacêutica, 18 1169-075 Lisboa	Tel.: + 351 21 319 13 3x Fax: + 351 21 319 13 99	congresso@ordemfarmaceuticos.pt	- 1 / 1 -

APÊNDICE H – Resumo enviado a XXIII Jornadas de Jovens Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.

XXIII Jornadas de Jovens Investigadores de AUGM

9

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ UTILIZANDO ÁCIDO ELÁGICO E PUNICALAGINA COMO MARCADORES ATIVOS

BRÊTAS, Juliana Machado¹; CÉSAR, Isabela da Costa²; EVANGELISTA, Fernanda Cristina Gontijo³; PEREIRA, Diego Beltrão⁴; PIANETTI, Gerson Antônio⁵; SABINO, Adriano de Paula⁶

¹Pesquisador Principal; ²Orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais

^{1,2,4,5}Faculdade de Farmácia – Departamento de Produtos Farmacêuticos.

^{1,3,6}Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Belo Horizonte – Brasil

diego.bp@outlook.com – jubretas@gmail.com – fernandacge@gmail.com

A *Punica granatum L.*, conhecida no Brasil como romã, é originária da Ásia, sendo cultivada em diversas regiões subtropicais. A parte mais utilizada na terapêutica é a casca do fruto e o mesocarpo, onde estão concentrados taninos hidrolisáveis, como a punicalagina (PUN) e o ácido elágico (AE). Além das diversas atividades biológicas atribuídas ao extrato seco da casca de romã, há registros científicos de que os taninos possuem atividade antitumoral. A identificação de taninos característicos da romã, como a PUN, é fundamental para o controle de qualidade de fitoterápicos, assegurando que não houve adulteração do extrato. A cromatografia em camada delgada (CCD) permite a identificação da composição dos extratos de forma barata e rápida, viabilizando sua utilização em farmácias magistrais e indústrias de pequeno porte. Desse modo, desenvolveu-se um método de CCD para identificação de AE e PUN em 18 extratos secos obtidos por doação, sendo verificada uma grande diferença entre os perfis cromatográficos dos extratos. Após a etapa de identificação, fez-se uma avaliação preliminar da atividade antitumoral de quatro extratos e dos padrões de AE e PUN através do ensaio de redução do MTT, utilizando linhagem celular humana de carcinoma de cólon retal (RKO-AS45-1). Os padrões de AE e PUN foram eficazes contra essa linhagem com IC₅₀ de 20,95 µg/mL ± 1,12 e 22,85 µg/mL ± 1,01, respectivamente. Entretanto, a atividade citotóxica dos extratos avaliados não foi tão significativa (IC₅₀ médio de 194,56 µg/mL ± 9,45). Embora a causa dessa discrepância ainda esteja sob investigação, fica evidente a importância da realização de estudos científicos para a confirmação das indicações "off label" de uso dos extratos secos de romã, garantindo a segurança dos pacientes.

Palavras-chave: Romã – Taninos hidrolisáveis – Atividade antitumoral

Palabras clave: Granada – Taninos hidrolizables – Actividad antitumoral

APÊNDICE I – Resumo enviado a XXIV Semana de Iniciação Científica da UFMG.

UFMG
SEMANA do CONHECIMENTO | *luminosidades*
 2015

CERTIFICADO

XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / PRPQ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ UTILIZANDO ÁCIDO ELÁGICO E PUNICALAGINA COMO MARCADORES ATIVOS.

AUTORES
 DIEGO BELTRAO PEREIRA
 ISABELA DA COSTA CESAR
 JULIANA MACHADO BRÉTAS
 FERNANDA CRISTINA GONTIJO EVANGELISTA
 ADRIANO DE PAULA SABINO
 GERSON ANTÔNIO PLANETTI

RESUMO
 A PUNICA GRANATUM L., POPULARMENTE CONHECIDA NO BRASIL COMO ROMÃ, É ORIGINÁRIA DA ÁSIA, SENDO CULTIVADA EM DIVERSAS REGIÕES SUBTROPICAIS. É USADA HÁ SÉCULOS, DESDE O ANTIGO EGITO (3.500 A.C.), COMO TÔNICO PARA CORAÇÃO E GARGANTA E NO TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES, TOSSES, DIARREIAS, VERMINOSES INTESTINAIS, DIABETES, PLACA DENTÁRIA E INFERTILIDADE. NA CASCA E NO MESOCARPO DA ROMÃ ESTÃO CONCENTRADOS COMPOSTOS FENÓLICOS, RESPONSÁVEIS POR 92% DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ASSOCIADA À FRUTA, ALÉM DAS PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS COMO COR E ADSTRINGÊNCIA. POR ISSO, A PARTE MAIS UTILIZADA NA TERAPÊUTICA É A CASCA DO FRUTO E O MESOCARPO, ONDE ESTÃO CONCENTRADOS TANINOS HIDROLISÁVEIS, COMO A PUNICALAGINA (PNG) E O ÁCIDO ELÁGICO (AE). ALÉM DAS DIVERSAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS AO EXTRATO SECO DA CASCA DE ROMÃ, HÁ REGISTROS CIENTÍFICOS DE QUE OS TANINOS POSSUEM ATIVIDADE ANTITUMORAL. A IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS CARACTERÍSTICOS DA ROMÃ, COMO A PNG, É FUNDAMENTAL PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS, ASSEGURANDO QUE NÃO HOUE ADULTERAÇÃO DO EXTRATO. A CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) É UMA TÉCNICA QUE PERMITE A IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE FORMA BARATA E RÁPIDA, VIABILIZANDO SUA UTILIZAÇÃO EM FARMÁCIAS MAGISTRAIS E INDÚSTRIAS DE PEQUENO PORTE. DESSE MODO, DESENVOLVEU-SE UM MÉTODO DE CCD PARA IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA DE AE E PNG EM 19 EXTRATOS SECOS OBTIDOS POR DOAÇÃO, SENDO VERIFICADA UMA GRANDE DIFERENÇA ENTRE OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS. APÓS A ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO, FEZ-SE UMA AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE QUATRO EXTRATOS E DOS PADRÕES DE AE E PNG ATRAVÉS DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT, UTILIZANDO LINHAGEM CELULAR HUMANA DE CARCINOMA DE CÓLON RETAL (RKO-AS45-1). OS PADRÕES DE AE E PNG FORAM EFICAZES CONTRA ESSA LINHAGEM COM IC50 DE 21,50 MG/ML ± 0,78 E 20,84 MG/ML ± 2,84, RESPECTIVAMENTE. ENTRETANTO, A ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS AVALIADOS NÃO FOI TÃO SIGNIFICATIVA (IC50 MÉDIO DE 196,16 MG/ML). EMBORA A CAUSA DESSA DISCREPÂNCIA AINDA ESTEJA SOB INVESTIGAÇÃO, FICA EVIDENTE A IMPORTÂNCIA DA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS CIENTÍFICOS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS INDICAÇÕES "OFF LABEL" DE USO DOS EXTRATOS SECOS DE ROMÃ, GARANTINDO A SEGURANÇA DOS PACIENTES.

PALAVRAS-CHAVE: ROMÃ, CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, ÁCIDO ELÁGICO, PUNICALAGINA, ANTITUMORAL

ANEXOS

ANEXO A – Confirmação de submissão de artigo à *Current Analytical Chemistry*.

From: **Current Analytical Chemistry** <cac@benthamscience.org>
Date: sex, 28 de set de 2018 às 11:02
Subject: Submission Acknowledgement | BMS-CAC-2018-165
To: <isacesar@gmail.com>
Cc: <cac@benthamscience.org>, <syedfaizan@benthamscience.org>

Reference#: BMS-CAC-2018-165

Submission Title: Miniaturized spectrophotometric method for quantification of tannins in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel dried extracts

Dear Dr. César,

Thank you for your submission to "Current Analytical Chemistry(CAC)". It will be sent to the Editor in Chief for his initial provisional approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **CrossCheck's iThenticate software** to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's **Ethical Guidelines for Publication**, all manuscript are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <https://benthamscience.com/journals/current-analytical-chemistry/editorial-policies/#top>.

The recommended number of references as per norm (<https://clarivate.com/essays/impact-factor/>) for Review Articles is approximately 100 or more, for Research Articles 75 or more, for Mini Reviews 75 or more & for Letter Articles 50 or more. Articles which are well referenced (100 or more references) may have high chances of acceptance by referees and they are likely to attract a greater number of citations.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name: Samuel Achilefu
Affiliation: Washington University, Analytical Chemistry
Country: USA
Email: achilefu@wustl.edu

Few tips to enhance the visibility & citations of your article:

- Selection of Appropriate Keywords: Choose important and relevant keywords that researchers in your field will be searching for so that your paper will appear in a database search. In biomedical fields, MeSH terms are a good 'common vocabulary' source to draw keywords from <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>
- The names of the authors should be provided according to the previous citations or as the authors would want them to be published along with the institutional affiliations, current address, telephone, cell & fax numbers and the email address. Email address must be provided with an asterisk in front of the name of the principal author. The corresponding author(s) should be designated and their complete address, business telephone and fax numbers and e-mail address must be stated to receive correspondence and galley proofs. It is also suggested to regularly update your profile on SCOPUS and other databases.
- Authors should avoid the use of non-standard abbreviations and Question marks in titles.

Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write info@benthamscience.org


Sincerely,

Ambreen Irshad
Senior Editor
Bentham Science Publishers
ambreenirshad@benthamscience.org
cac@benthamscience.org
<https://benthamscience.com/journals/current-analytical-chemistry/#top>

ANEXO B – Certificado da CEUA para realização da avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum* L..

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>UFMG</p>	
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 186 / 2016, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos secos da casca do fruto de <i>Punica granatum</i>", que tem como responsável Isabela da Costa César, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 07/06/2016. Este certificado expira-se em 07/06/2021.</p>	
<p>CERTIFICATE</p>	
<p>We hereby certify that the Protocol nº. 186 / 2016, related to the Project entitled "Evaluation of anti-inflammatory activity dry extracts from the bark the fruit of <i>Punica granatum</i>", under the supervision of Isabela da Costa César, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/06/2016. This certificates expires in 07/06/2021.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 07/06/2016.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005. 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

ANEXO C – Certificado do COEP para realização da avaliação do impacto de extratos secos da casca do fruto de *Punica granatum* L. sobre a hemostasia.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

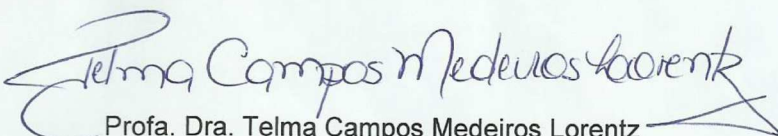
**Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)**" com as alterações:

- Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfóides e mielodisplasia";
- Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de efeito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO D – Certificado de apresentação de trabalho no VI ABCF Congress.

CERTIFICATE

We certify that the work **MINIATURIZED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTIFICATION OF TANNINS IN POMEGRANATE (PUNICA GRANATUM L.) FRUIT PEEL DRIED EXTRACTS.**, authorship of **JULIANA MACHADO BRÊTAS , DIEGO BELTRÃO PEREIRA, ISABELA DA COSTA CÉSAR, GERSON ANTÔNIO PIANETTI**, was presented as **POSTER PRESENTATION** at the **IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care**, held in **São Paulo (SP), Brazil**, from **September 6 to 8, 2018**.



Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress



Teresa Dalla Costa
President ABCF



ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMÉRCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

ANEXO E – Certificado de trabalho premiado no VI ABCF Congress.

CERTIFICATE

We certify that the work **“MINIATURIZED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTIFICATION OF TANNINS IN POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) FRUIT PEEL DRIED EXTRACTS”**, authorship of **JULIANA MACHADO BRÊTAS¹, DIEGO BELTRÃO PEREIRA¹, ISABELA DA COSTA CÉSAR¹, GERSON ANTÔNIO PIANETTI.**, was selected as the best presentation of the Poster Session **Analytical Methods for Drugs and Medicines** at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.


Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress


Teresa Dalla Costa
President ABCF


ABCF 15
ANOS

**IV ABCF CONGRESS**

ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMÉRCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

ANEXO F – Certificado de apresentação de trabalho na XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



XXV JORNADAS DE
JÓVENES INVESTIGADORES
AUGM - UNI
ENCARNACIÓN - PARAGUAY



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE ITAPUA

INVESTIGACIÓN SIN FRONTERAS
PARA LA INTEGRACIÓN CIENTÍFICA Y CULTURAL

CERTIFICADO
Otorgado a
Juliana Machado Bretas
Por su participación como investigador/a en las
XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM 2017,
realizadas en Encarnación - Paraguay, los días 18, 19 y 20 de Octubre.
Trabajo Titulado: "Extratos secos da casca do fruto de romã (Punica granatum L.). Determinação dos teores de ácido elágico e punicalagina por CLAE-UV e avaliação da atividade antibacteriana e do potencial antioxidante"


Dr. Waldo Albarracín
Presidente AUGM


Dr. Álvaro Maglia
Secretario Ejecutivo AUGM


Prof. Ing. Hildegardo González Irala
Rector UNI

ANEXO G – Certificado de apresentação de trabalho no XII Congresso Mundial de Farmacêuticos da Língua Portuguesa.



XII Congresso Mundial de FARMACÊUTICOS de Língua Portuguesa

V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde
Congresso Internacional de Fitoterapia
I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética
I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos





Certificado

Certificamos que foi apresentado o trabalho científico intitulado **“AVALIAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO E PUNICALAGINA EM EXTRATOS SECOS DA CASCA DO FRUTO DE PUNICA GRANATUM”** de autoria de JULIANA MACHADO BRÊTAS; DIEGO BELTRÃO PEREIRA; ISABELA DA COSTA CÉSAR; NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS; GERSON ANTÔNIO PIANETTI, no XII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa; V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde; Congresso Internacional de Fitoterapia; I Congresso Brasileiro de Farmácia Estética e I Simpósio Farmacêutico de Nutracêuticos, com carga horária de 30 horas, realizados pelos Conselho Federal de Farmácia, Associação de Farmacêuticos dos Países de Língua Portuguesa e Fundação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, com parceria institucional do Conselho Regional de Farmácia do Rio Grande do Sul, nos dias 8, 9 e 10 de novembro de 2016, em Gramado, Rio Grande do Sul.

Gramado - RS, 10 de novembro de 2016.



Walter da Silva Jorge João
Presidente do Conselho Federal de Farmácia



Valmir de Santi
Presidente do XII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa



Carlos André Oeiras Sena
Presidente da Fundação Brasileira de Ciências Farmacêuticas

ANEXO H – Certificado de apresentação de trabalho no III Simpósio de Microbiologia da UFMG.



III SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG
DOENÇAS MICROBIANAS EMERGENTES

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho Serafim, M.S.M.; Brêtas, J.M.; César, I.C.; Mota, B.E.F. foi apresentado na qualidade PÔSTER, tendo como autores **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ EM BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO** no “III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2016, com carga horária de 16h.


 Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
 Coordenadora III Simpósio de Microbiologia da UFMG


 Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



ANEXO I – Certificado de apresentação de trabalho na XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG.



**Semana
Conhecimento** | UFMG
2016
Cultivar Vidas: Ciência e Sociedade



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS SECOS DA CASCA DE ROMÃ EM BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO", FOI APRESENTADO NA XXV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA , PROMOVIDA PELA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, NO PERÍODO DE 17-10-2016 A 21-10-2016.


AUTOR(A): MATEUS SA MAGALHAES SERAFIM
 ORIENTADOR(A): BRUNO EDUARDO FERNANDES MOTA DO(A) FACULDADE DE FARMÁCIA.
 CO-AUTORES: JULIANA MACHADO BRÊTAS, ISABELA COSTA CÉSAR, BRUNO EDUARDO FERNANDES MOTA, GERSON ANTÔNIO PIANETTI

Mônica Maria Diniz Leão
 MÔNICA MARIA DINIZ LEÃO
 PRÓ-REITORA ADJUNTA DE PESQUISA



realização **UFMG**


ANEXO J – Certificado de apresentação de trabalho no Congresso Nacional dos Farmacêuticos de 2015. Evento organizado pela Ordem dos Farmacêuticos de Portugal.



DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que **Juliana Machado Brêtas** apresentou um trabalho na forma de *poster* intitulado "Identificação e avaliação das atividades antitumoral e hemostática de extratos secos da casca de romã utilizando ácido elágico e punicalagina como marcadores ativos.", no âmbito do Congresso Nacional dos Farmacêuticos'2015, evento organizado pela Ordem dos Farmacêuticos e que teve lugar nos dias 29, 30 e 31 de Outubro de 2015, no Centro de Congressos de Lisboa.

O Secretário-Geral



Dr. Bruno Macedo

DIRECÇÃO NACIONAL
Rua da Sociedade Farmacêutica 16, 1109-075 Lisboa I NIF: 500 998 760
Tel: 21 319 13 00/11 Fax: 21 319 13 95/15 e-mail: direcção.nacional@ordemdosfarmaceuticos.pt | www.ordemdosfarmaceuticos.pt

ANEXO K – Certificado de apresentação de trabalho na XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.

XXIII Jornadas
Jóvenes Investigadores
GRUPO MONTEVIDEO
Universidad Nacional de La Plata
La Plata - Argentina - 25, 26 y 27 de Agosto - 2015





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Se certifica que el trabajo *... Avaliação da atividade antitumoral de extratos secos da casca de romã utilizando ácido elágico e punicalagina como marcadores ativos de Fernanda Cristina Gontijo Evangelista, Juliana Machado Britas y Diego Beltrão Pereira..*

ha participado en las **XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo**, realizadas en la Universidad Nacional de La Plata los días 25, 26 y 27 de Agosto de 2015.


 Lic. Francisco Javier Díaz
Secretario de Relaciones Institucionales


 Prof. Dr. Álvaro Maglia
Secretario Ejecutivo AUGM


 Lic. Raúl Perdomo
Presidente

ANEXO L – Certificado de apresentação de trabalho na XXIV Semana de Iniciação Científica da UFMG.